

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



CONTRIBUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE INFEÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM
VITELOS DE EXPLORAÇÕES DE CARNE DAS SUB-REGIÕES DO ALENTEJO CENTRAL E
LITORAL

JOÃO MANUEL GOUVEIA SARAMAGO

ORIENTADOR:
Dr. Feliciano José Malta do Carmo Reis

COORIENTADOR:
Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2019

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



CONTRIBUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE INFEÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM
VITELOS DE EXPLORAÇÕES DE CARNE DAS SUB-REGIÕES DO ALENTEJO CENTRAL E
LITORAL

JOÃO MANUEL GOUVEIA SARAMAGO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

VOGAIS:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Dr. Feliciano José Malta do Carmo Reis

ORIENTADOR:

Dr. Feliciano José Malta do Carmo Reis

COORIENTADOR:

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2019

Nome: João Manuel Gouveia Saramago

Título da Tese ou
Dissertação: CONTRIBUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE INFEÇÃO POR
Cryptosporidium spp. EM VITELOS DE EXPLORAÇÕES DE
CARNE DAS SUB-REGIÕES DO ALENTEJO CENTRAL E
LITORAL

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas
públicas): 2019

Designação do curso
de Mestrado ou de
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- ☐ Clínica ☐ Produção Animal e Segurança Alimentar
☐ Morfologia e Função ☒ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 09 de dezembro de 2019

Assinatura: _____

“Eu bem sei, meu Amor, que pra viver
São precisos amores, pra morrer
E são precisos sonhos pra partir”

“Amor que morre”

Florbela Espanca

Ao meu avô João e à minha amiga Sofia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Dr. Feliciano Reis, pela oportunidade que me deu na VETAGROMOR, Lda. e por toda a confiança que depositou em mim ao longo deste tempo. Por toda a paciência e partilha de experiências valiosas.

Ao meu Coorientador, Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, pela disponibilidade que sempre demonstrou ao longo da execução deste trabalho e, acima de tudo, pela amizade e boa disposição ao longo destes anos e por ter despoletado em mim este gosto pela Parasitologia.

A toda a equipa da VETAGROMOR, Lda., Dr. José Luís Castro, Dr. António Bastos, Dr.^a Maria Ana Pinheiro e ao auxiliar de veterinária Amadeu Santos, um agradecimento especial pela amizade e pelo excelente ambiente de trabalho que proporcionam e que fazem do dia-a-dia um prazer. Agradeço também a ajuda impagável que me deram na colheita das amostras para a realização do estudo.

A todos os membros do Laboratório Veterinário da Coprapec de Montemor-o-Novo, em especial às Dr.^a Isabel Mariano e Dr.^a Sílvia Lopes, pela autorização concedida para a realização de toda a parte laboratorial do estudo naquelas instalações.

À analista Carla Sampaio, do Laboratório Veterinário da Coprapec de Montemor-o-Novo, pela ajuda preciosa que me deu na realização das técnicas laboratoriais e validação das minhas observações ao microscópio.

A todos os proprietários das explorações alvo de estudo que me permitiram a colheita das amostras aos seus animais.

À Professora Doutora Isabel Fonseca, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, pela ajuda e orientação que me deu na fase inicial deste estudo.

Ao Professor José Júlio Alfaro Cardoso, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, pelos conselhos e ensinamentos que me foi transmitindo de forma apaixonada ao longo do curso e, acima de tudo, pelo encorajamento na mudança de perspetiva de estágio e que me levou a abraçar novas oportunidades.

Ao Tenente-Coronel Artur Alves pela forma acolhedora com que me recebeu em Montemor-o-Novo.

Aos meus Professores Carlos Simões e Dario Vaz pela amizade e importância que tiveram ao longo do meu percurso escolar.

Aos meus fiéis amigos, Bernardo e Margarida Fura, Rita Reis, Fábio Santos, Diana Lopes, Raquel Rodrigues, Maria Inês Antunes, Carla Fonseca, Adriana Amorete, Fran e Inês Puebla, Rita e Sofia Correia, Romi e Pedro Ribeiro, que me acompanham sempre em todas as etapas da minha vida.

A duas pessoas muito especiais que, infelizmente, já não veem o concluir desta caminhada, mas que muito contribuíram para ela e, mais importante que isso, para o que hoje sou, o meu avô João Gouveia e a minha amiga Sofia Monteiro. Por serem uma verdadeira fonte de inspiração para mim e modelos de luta e perseverança. Levo-os para todo o lado. A vós!

À Rita por tudo o que me acrescenta enquanto pessoa e por todo o apoio que sempre me dá, em particular nos momentos menos bons. Por ser um pilar inabalável da minha vida, um exemplo de luta e persistência e um enorme orgulho para mim.

A toda a minha família, em especial à minha avó Tinita, aos meus tios Ana, Ricardo, Paulo, Lena, Margarida e Francisco e aos meus primos Gouveia.

Aos meus padrinhos, Belém e Zé. Não me recordo sequer de uma vida sem eles e agradeço-lhes a amizade e presença constante ao longo dos meus 25 anos de existência.

À Lola pelos 25 anos de amizade e por ser a pessoa mais genuína e bondosa que conheço.

Aos meus pais e irmãos e ao Luigi e à Susana.

Obrigado Mãe, por seres uma inspiração de bravura, luta e dedicação. Porque admiro muito tudo o que fizeste por mim, mesmo em tempos difíceis em que seria fácil perder o norte. És um verdadeiro orgulho.

Obrigado Pai, por seres determinado, trabalhador e, mais que isso, amigo. És, de facto, um modelo a seguir. Foco e objetivo. “Porque o sucesso só vem antes do trabalho no dicionário”.

Obrigado José, por sermos o mais próximos que dois irmãos podem ser e por te considerar um verdadeiro amigo para a vida.

Muito obrigado a todos,

João

**CONTRIBUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp.
EM VITELOS DE EXPLORAÇÕES DE CARNE DAS SUB-REGIÕES DO ALENTEJO
CENTRAL E LITORAL**

RESUMO

A criptosporidiose é uma zoonose difundida por todo o mundo e é provocada por protozoários pertencentes ao género *Cryptosporidium* que têm a capacidade de infetar mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. A via de transmissão do parasita é fecal-oral podendo ocorrer de forma direta através do contacto com fezes provenientes de animais portadores ou de forma indireta através do contacto com superfícies, águas ou alimentos contaminados com oocistos esporulados. Os vitelos infetam-se nos primeiros dias de vida, sendo estes os principais responsáveis pela perpetuação da doença nas explorações.

Este estudo teve como principal objetivo a avaliação da percentagem de infeção de *Cryptosporidium* spp. em vitelos pertencentes a explorações de carne do Alentejo Central e Litoral. As amostras foram obtidas por conveniência a partir de 105 vitelos com idades compreendidas entre os 10 e os 30 dias de vida e pertencentes a 22 explorações sediadas nas referidas sub-regiões. Os resultados foram obtidos através de observação ao microscópio das amostras após realizados os esfregaços fecais e respetivas colorações com a técnica de Ziehl-Neelsen modificada.

A percentagem global de infeção por *Cryptosporidium* spp. ficou definida em 25,7% dos animais examinados e 63,6% das explorações alvo de estudo apresentaram pelo menos um animal positivo à observação microscópica das amostras.

Os dados obtidos demonstraram uma forte relação entre a consistência das fezes e a presença de *Cryptosporidium* spp., sendo que 48,5% dos animais com fezes diarreicas na altura na colheita das amostras apresentaram-se infetados pelo parasita.

Embora o lactato de halofuginona esteja descrito como tratamento efetivo para o *Cryptosporidium* spp., a execução do seu protocolo em explorações em regime extensivo não é fácil e as melhores alternativas passam pela adoção de boas práticas de manejo, tratamento das águas de bebida dos animais e vacinação do efetivo contra outros agentes patogénicos causadores de diarreias neonatais.

Palavras-chave: bovinos de carne; vitelos; *Cryptosporidium* spp.; percentagem de infeção; Alentejo Central e Litoral; Portugal.

CONTRIBUTION TO THE DETERMINATION OF *Cryptosporidium* spp. INFECTION IN CALVES OF BEEF FARMS FROM CENTRAL AND COASTAL ALENTEJO SUB-REGIONS

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a widespread zoonosis caused by protozoa of the genus *Cryptosporidium*. They are parasites that have the ability to infect mammals, birds, reptiles, amphibians and fish. The parasite transmission pathway is fecal-oral and may occur directly through contact with feces from animal carriers or indirectly through contact with surfaces, waters or food contaminated with sporulated oocysts. Calves become infected in their first days of life, and these are the main responsible for the perpetuation of the disease on the farms.

The main objective of this study was to evaluate the percentage of *Cryptosporidium* spp. infection in calves belonging to beef cattle farms in the Central and Coastal Alentejo. Convenience sampling was obtained from 105 calves aged between 10 and 30 days old and belonging to 22 farms based in these sub-regions. The results were obtained by microscopic observation of the samples after being colored with modified Ziehl-Neelsen technique.

The overall percentage of *Cryptosporidium* spp. infection was defined in 25.7% and 63.6% of the study target farms presented at least one positive animal to the microscopic observation of the samples.

The obtained data showed a strong relationship between feces consistency and the presence of *Cryptosporidium* spp. A percentage of 48.5% of the animals with diarrheal feces at the time of sampling were infected by the parasite.

Although halofuginone lactate is described as an effective treatment for *Cryptosporidium* spp. the protocol in beef farms is not easy to apply and the best alternatives are the adoption of good animal husbandry practices, treatment of animal drinking water and vaccination of herds against pathogens which cause neonatal diarrhea.

Key-words: beef cattle; calves; *Cryptosporidium* spp.; infection percentage, Central and Coastal Alentejo; Portugal.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – RELATÓRIO DE ATIVIDADES DE ESTÁGIO	2
CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DA CRIPTOSPORIDIOSE	5
3.1.1. ENQUADRAMENTO HISTÓRICO	5
3.1.2. O PARASITA.....	5
3.1.3. CARACTERÍSTICAS DO GÉNERO <i>Cryptosporidium</i>	7
a) Morfologia	7
b) <i>Cryptosporidium</i> no meio ambiente	9
c) Microbiótoto	9
3.1.4. CICLO DE VIDA	10
a) Desenquistamento	11
b) Invasão celular.....	11
c) Multiplicação assexuada.....	12
d) Reprodução sexuada.....	12
e) Esporogonia.....	13
f) Períodos pré-patente e patente	13
3.2. EPIDEMIOLOGIA DA CRIPTOSPORIDIOSE	13
3.2.1. DISTRIBUIÇÃO.....	14
3.2.2. TRANSMISSÃO	14
3.2.3. HOSPEDEIROS	15
3.2.4. IMPLICAÇÕES NA SAÚDE PÚBLICA	15
3.3. CRIPTOSPORIDIOSE BOVINA.....	17
3.3.1. ESPÉCIES QUE PARASITAM OS BOVINOS	17
3.3.2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	18
3.3.3. DISTRIBUIÇÃO E PREVALÊNCIA DA DOENÇA.....	19
3.3.4. TRANSMISSÃO DE <i>Cryptosporidium</i> spp. NOS BOVINOS	21
a) Transmissão direta	21
b) Transmissão indireta.....	21

3.3.5.	FATORES DE RISCO	22
a)	Dimensão do efetivo	22
b)	Idade	22
c)	Tipo de exploração	23
d)	Sazonalidade e época de partos	23
e)	Qualidade da água de bebida.....	23
f)	Infeções concomitantes	24
3.3.6.	PATOGENIA	24
3.3.7.	SINAIS CLÍNICOS.....	25
3.3.8.	FISIOPATOLOGIA DA DIARREIA	25
3.3.9.	RESPOSTAS IMUNITÁRIAS À INFEÇÃO POR <i>Cryptosporidium</i> spp.....	27
a)	Imunidade humoral	27
b)	Imunidade celular.....	28
3.3.10.	DIAGNÓSTICO	29
a)	Deteção do parasita.....	29
b)	Deteção de antígeno	30
c)	Deteção de anticorpos	30
d)	Deteção de DNA.....	31
3.3.11.	TRATAMENTO.....	31
3.3.12.	PROFILAXIA E CONTROLO	32
3.3.13.	DIFICULDADE DE ERRADICAÇÃO	33
3.3.14.	IMPACTO ECONÓMICO	34
CAPÍTULO 4 – CONTRIBUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE INFEÇÃO POR <i>Cryptosporidium</i> spp. EM VITELOS DE EXPLORAÇÕES DE CARNE DAS SUB-REGIÕES DO ALENTEJO CENTRAL E LITORAL.....		35
4.1.	OBJETIVOS	35
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.2.1.	ÁREA GEOGRÁFICA ABRANGIDA PELO ESTUDO.....	35
4.2.2.	EXPLORAÇÃO EM REGIME EXTENSIVO	37
4.2.3.	AMOSTRAGEM	37
4.2.4.	INQUÉRITO	37
4.2.5.	COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	38
4.2.6.	DETEÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp.....	38
a)	Obtenção dos esfregaços fecais.....	38
b)	Coloração de Ziehl-Neelsen modificada	39
c)	Observação ao microscópio	40
4.3.	RESULTADOS	41

4.3.1.	DADOS PARASITOLÓGICOS	41
a)	Percentagem global de infeção	41
b)	Explorações com animais positivos	42
c)	Percentagem de infeção nas sub-regiões	42
d)	Concelhos positivos	43
e)	Explorações positivas por concelho.....	43
f)	Animais positivos por concelho.....	44
g)	Percentagem de infeção nos concelhos <i>versus</i> percentagem de infeção face ao total de animais examinados.....	45
h)	Animais positivos por exploração	47
i)	Consistência das fezes e positividade das amostras	49
j)	Reidratação endovenosa e positividade das amostras	50
k)	Vacinação das fêmeas gestantes contra <i>E. coli</i> , rotavírus e coronavírus e positividade das amostras.....	51
4.3.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES COM BASE NO INQUÉRITO	52
4.4.	DISCUSSÃO	52
4.5.	CONCLUSÕES	58
	BIBLIOGRAFIA	59
	ANEXOS	63
	ANEXO 1 – INQUÉRITO	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Alguns casos com participação ocorridos durante o período de estágio curricular.....	3
Tabela 2. Algumas espécies de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	6
Tabela 3. Animais positivos por exploração.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prolapso vaginal em bovino (A) e respetiva resolução (B)	2
Figura 2. Prolapso uterino em bovino (A) e respetiva resolução (B)	3
Figura 3. Oocistos de <i>C. parvum</i> (A), <i>C. hominis</i> (B) e <i>C. meleagridis</i> (C)	8
Figura 4. Representação do esporozoítio de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	8
Figura 5. Ciclo de vida do <i>Cryptosporidium parvum</i>	11
Figura 6. Representação da invasão das células epiteliais do intestino por <i>Cryptosporidium</i> spp.....	12
Figura 7. Estudo longitudinal de prevalência em Maryland (EUA) de <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>C. parvum</i> , <i>C. bovis</i> , <i>C. andersoni</i> e <i>C. ryanae</i> em vitelos acompanhados desde a primeira semana de vida até aos 24 meses de idade	20
Figura 8. Mucosa do íleo de um vitelo saudável (A) e de um vitelo infetado por <i>C. parvum</i> (B).....	26
Figura 9. Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. corados com Ziehl-Neelsen modificada.....	30
Figura 10. Concelhos alvo de estudo (a vermelho)	36
Figura 11. Esfregaços fecais (A) e técnica de Ziehl-Neelsen modificada: fixação com álcool metílico (B), colorações com fucsina (C) e verde malaquite (D).....	39
Figura 12. Lâminas após coloração por Ziehl-Neelsen modificada	40
Figura 13. Observação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. numa ampliação de 1000x.....	41

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Casuística na área da reprodução e obstetrícia de ruminantes	4
Gráfico 2. Distribuição dos diferentes procedimentos dentro da casuística reprodutiva dos pequenos ruminantes.....	4
Gráfico 3. Distribuição dos diferentes procedimentos dentro da casuística reprodutiva dos bovinos.....	4
Gráfico 4. Percentagem de infeção dentro das sub-regiões alvo de estudo e o respetivo peso na totalidade de animais testados.....	42
Gráfico 5. Explorações positivas por concelho	44
Gráfico 6. Animais positivos por concelho	45
Gráfico 7. Percentagem de infeção nos concelhos <i>versus</i> percentagem de infeção face à globalidade de animais testados	47
Gráfico 8. Distribuição das amostras por consistências fecais face à amostragem total.....	49
Gráfico 9. Distribuição das amostras por consistências fecais face à amostragem total e percentagem de animais positivos dentro dos três grupos	50
Gráfico 10. Comparação entre os animais alvo de reidratação endovenosa e aqueles em que não houve atuação do médico veterinário a este nível e respetivas percentagens de infeção.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BVD – diarreia viral bovina

Cl⁻ – cloro

cm – centímetro

DNA – ácido desoxirribonucleico

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

HCO₃⁻ – bicarbonato

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

kg – quilograma

km – quilómetro

mJ – milijoule

mL – mililitro

NaCl – cloreto de sódio

nm – nanómetro

p23 – proteína recombinante p23

PCR – Polymerase Chain Reaction

pH – potencial hidrogeniónico

RNA – ácido ribonucleico

µg – micrograma

µm – micrómetro

°C – graus Celsius

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A criptosporidiose é uma zoonose difundida por todo o mundo e é provocada por protozoários pertencentes ao género *Cryptosporidium* que têm a capacidade de infetar mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (De Graaf, Vanopdenbosch, Ortega-Mora, Abbassi, Peeters, 1999).

O género *Cryptosporidium* prevalece na natureza através de oocistos esporulados que constituem a sua forma infetante. Estes oocistos têm distribuição ubiqüitária, possuem grande resistência a variados agentes físicos e químicos e apresentam uma elevada capacidade reprodutiva (De Graaf et al., 1999).

O seu ciclo de vida é direto e monoxeno. O parasita apresenta uma localização extracitoplasmática e tem capacidade de autoinfecção, características que lhe permitem uma elevada disseminação no ambiente e, conseqüentemente, dispersão e perpetuação da doença (De Graaf et al., 1999).

A via de transmissão é fecal-oral, constituindo os oocistos esporulados a forma infetante. A propagação da doença pode ser feita por contacto direto entre os animais afetados ou indiretamente através da ingestão de alimentos e/ou águas contaminadas.

Cryptosporidium parvum parece ser o principal responsável pelo aparecimento de diarreias neonatais em vitelos, como agente etiológico isolado ou em combinação com outros, nomeadamente o Rotavírus. Esta espécie demonstra um elevado potencial zoonótico, sendo que os vitelos infetados têm sido associados ao aparecimento de surtos de criptosporidiose humana. Vitelos infetados por *Cryptosporidium parvum* podem revelar-se assintomáticos ou desenvolver diarreia líquida e profusa com conseqüente desidratação, anorexia e, em casos mais severos, podendo conduzir à morte (Madeira de Carvalho, Martins, Sousa, Bacelar & da Silva, 2011).

Os vitelos são infetados no primeiro mês de vida, sendo os principais responsáveis pela perpetuação da infeção nas explorações e pela disseminação ambiental do parasita.

Ainda não é possível definir satisfatoriamente um método para prevenir a infeção e, por conseguinte, a identificação dos fatores de risco e posteriores medidas corretivas assumem papéis chave na tentativa de reduzir as perdas económicas associadas à doença e os níveis de contaminação ambiental que ela acarreta. A criptosporidiose bovina encontra nos vitelos o seu principal reservatório e, dessa forma, este estudo tem como principal objetivo investigar a presença de *Cryptosporidium* spp. em vitelos de carne pertencentes a explorações das sub-regiões do Alentejo Central e Litoral.

CAPÍTULO 2 – RELATÓRIO DE ATIVIDADES DE ESTÁGIO

O estágio curricular foi realizado entre os dias 01 de outubro de 2018 e 31 de março de 2019 na empresa VETAGROMOR Lda., sediada em Montemor-o-Novo.

Durante este período tivemos o privilégio de acompanhar as atividades diárias dos médicos veterinários Dr. Feliciano Reis, Dr. José Luís Castro, Dr. António Bastos, Dr.^a Maria Ana Pinheiro e do auxiliar de veterinária Amadeu Santos.

A VETAGROMOR Lda. presta serviços veterinários a explorações situadas maioritariamente no distrito de Évora, tendo, em menor número, clientes sediados em concelhos pertencentes aos distritos de Setúbal e Portalegre.

Durante este período tivemos a oportunidade de dar assistência veterinária a diversos casos clínicos, auxiliar nas tarefas de saneamento dos efetivos bovinos, ovinos, caprinos e suínos e, ainda, presenciar várias atividades relacionadas com o manejo reprodutivo dos efetivos. Neste último campo, tivemos oportunidade de ver e realizar ecografias a bovinos, ovinos e caprinos, realizar exames andrológicos a bovinos e ovinos e participar em protocolos de sincronização deaios e inseminação artificial a tempo fixo em bovinos. A nível de urgências assistimos a diversos partos distócicos, à reidratação endovenosa de vitelos com sintomatologia diarreica e à resolução de problemas pós-parto como, por exemplo, prolapso vaginais e uterinos (Figuras 1 e 2).



Figura 1. Prolapso vaginal em bovino (A) e respetiva resolução (B) (original)



Figura 2. Prolapso uterino em bovino (A) e respectiva resolução (B) (original)

Na tabela 1 estão enumerados os casos considerados de maior relevância ocorridos durante o período de estágio curricular.

Tabela 1. Alguns casos com participação ocorridos durante o período de estágio curricular

Caso	Número
Pneumonia bacteriana (bovino)	4
Reidratação endovenosa (bovino – vitelos)	12
Metrite (bovino)	3
Mastite (bovino)	4
Impactação do omaso (bovino)	2
Prolapso vaginal (bovino)	1
Prolapso uterino (bovino)	2
Necrópsia (bovino)	7
Partos distócicos (bovino)	11
Cesarianas (bovino)	1
Retenção placentária (bovino)	3

A VETAGROMOR Lda. está munida de recursos humanos e equipamentos capazes de dar uma resposta competente no manejo reprodutivo dos efetivos bovinos, ovinos e caprinos. Ao longo do estágio curricular assistimos a cerca de 2764 diagnósticos de gestação por via ecográfica, a 113 exames andrológicos, a 13 partos distócicos e a 20 inseminações artificiais. Em todos eles, para além da aprendizagem através da observação, tivemos a possibilidade de realizar alguns dos procedimentos acima indicados.

Nos gráficos abaixo (1, 2 e 3) estão descritos os valores percentuais relativos ao manejo reprodutivo dos efetivos de ruminantes que presenciámos ao longo do nosso estágio curricular.

Gráfico 1. Casuística na área da reprodução e obstetrícia de ruminantes

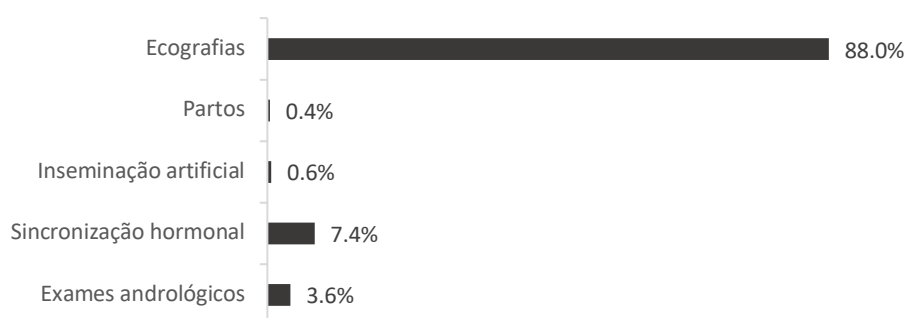


Gráfico 2. Distribuição dos diferentes procedimentos dentro da casuística reprodutiva dos pequenos ruminantes

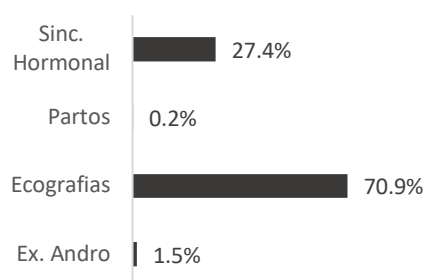
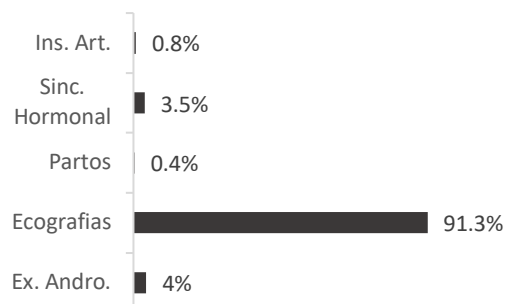


Gráfico 3. Distribuição dos diferentes procedimentos dentro da casuística reprodutiva dos bovinos



Parte do estágio curricular foi realizado, em simultâneo, no Laboratório da Coprapec de Montemor-o-Novo. Foi nesse espaço que nos foram possibilitados o processamento e observação das amostras recolhidas no campo para a realização do estudo em causa, sempre sob supervisão das médicas veterinárias Dr.^a Isabel Mariano e Dr.^a Sílvia Lopes, bem como da analista Carla Sampaio, cuja ajuda foi indispensável no planeamento e execução do estudo.

CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO DA CRIPTOSPORIDIOSE

1.1.1. ENQUADRAMENTO HISTÓRICO

Ernest Edward Tyzzer foi o primeiro a descrever o género *Cryptosporidium*, no ano de 1907, após assinalar estes protozoários nas glândulas gástricas de ratos de laboratório. Mais tarde, em 1910, Tyzzer publicou um trabalho sobre o ciclo de vida do parasita e mencionou a observação de organismos similares encontrados no epitélio intestinal de coelhos. Este parasita foi, na altura, declarado sem importância clínica para o Homem (Fayer, 2010).

Só no ano de 1976 foram relatados os primeiros casos de criptosporidiose humana por Nime et al. (1976) e Meisel et al (1976), que reportaram casos de criptosporidiose numa criança de três anos e num indivíduo imunocomprometido, respetivamente (Pereira da Fonseca, 2000). Desde então que a ligação do género *Cryptosporidium* ao aparecimento de doenças transmitidas pela água e alimentos tem estimulado o crescente interesse mundial no estudo destes parasitas (United States Environmental Protection Agency, 2001). *Cryptosporidium* sp. foi sendo cada vez mais associado aos surtos de diarreia em bovinos e humanos, nestes últimos em especial nos indivíduos imunodeprimidos, encorajando a comunidade científica a debruçar-se sobre o tema (Xiao, Fayer, Ryan & Upton, 2004).

Na vertente da Medicina Veterinária, e uma vez que a produção animal constitui uma fonte considerável de libertação de oocistos para o meio ambiente, tem vindo a ser cada vez mais monitorizada a presença destes protozoários nas explorações, sendo que o seu controlo é difícil e as perdas económicas e o impacto para a saúde pública são consequências alarmantes para quem contacta diretamente com estes animais (Martins, Sousa, Madeira de Carvalho, Bacellar & Cannas da Silva, 2007).

1.1.2. O PARASITA

Do género *Cryptosporidium* fazem parte os protozoários que são capazes de infetar peixes, aves, mamíferos, répteis e anfíbios. Este género de parasitas pertence ao reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Gregarinomorpha, subclasse Cryptogregarina, ordem Cryptogregarida e família Cryptosporidiidae (Ryan, Paparini, Monis & Hijawi, 2016).

Os indivíduos do género *Cryptosporidium* apresentam alguma especificidade de hospedeiro, capacidade de autoinfecção, algum grau de resistência à terapêutica

antiparasitária e morfologias idênticas entre espécies (Xiao et al., 2004). Inicialmente pensava-se que o parasita apenas se desenvolvia dentro das células hospedeiras, mas estudos mais recentes apontam para a capacidade do protozoário se multiplicar e desenvolver fora das células do hospedeiro. Acontece que, segundo Ryan et al. (2016), o parasita consegue desenvolver-se dentro e fora das células (intracelular e extracelular, respetivamente) em simultâneo no mesmo organismo hospedeiro.

Existem, atualmente, 31 espécies válidas de *Cryptosporidium* sp., algumas das quais com potencial de infeção do ser humano (OIE Terrestrial Manual - World Organisation for Animal Health, 2016; Ryan, Zahedi & Paparini, 2016; Hemphill, Müller & Müller, 2019). Alguns exemplos estão descritos abaixo, na tabela 2.

Tabela 2. Algumas espécies de *Cryptosporidium* spp. (adaptado de OIE Terrestrial Manual, 2016; Fayer, 2010; Xiao et al., 2004)

Espécie	Hospedeiros principais	Zoonótico
<i>C. molnari</i>	Peixes	Não
<i>C. serpentis</i>	Répteis	Não
<i>C. galli</i>	Galinhas	Não
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos e Caprinos	Não
<i>C. ryanae</i>	Bovinos	Não
<i>C. muris</i>	Roedores	Sim (raro)
<i>C. suis</i>	Suínos	Sim (raro)
<i>C. bovis</i>	Bovinos	Sim (raro)
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	Sim (raro)
<i>C. felis</i>	Gatos	Sim (ocasional)
<i>C. canis</i>	Cães	Sim (ocasional)
<i>C. meleagridis</i>	Aves e Mamíferos	Sim
<i>C. hominis</i>	Homem	Sim
<i>C. viatorum</i>	Homem	Sim
<i>C. parvum</i>	Ruminantes e Homem	Sim

1.1.3. CARACTERÍSTICAS DO GÉNERO *Cryptosporidium*

a) Morfologia

Os protozoários do género *Cryptosporidium* adquirem a capacidade infetante na forma de oocisto, que lhes confere resistência no meio ambiente e potenciais de disseminação e infeção.

Nas células intestinais, os parasitas apresentam um tamanho variável entre os 2 e os 6 μm . Os oocistos apresentam quatro esporozoítos, sem esporocistos, são ovais, apresentam oito cromossomas de tamanhos semelhantes e podem medir entre 4,5 e 7,9 μm (Rodriguez & Royo, 2001). Os oocistos apresentam uma parede que pode ser espessa ou fina dependendo da fase de desenvolvimento, apresentando-se, em média, com uma espessura de 50 nm, lisa e incolor. Esta parede é, na maioria dos casos, espessa, conferindo aos oocistos proteção contra as agressões do meio ambiente. No entanto, cerca de 20% destes oocistos apresentam uma parede fina, enquistando endogenamente e originando um fenómeno de autoinfeção (Rodriguez & Royo, 2001).

A camada externa é de espessura irregular e possui, em média, 10 nm. Por baixo desta camada supracitada encontra-se uma camada eletrodensa com cerca de 2,5 nm e abaixo desta última a camada mais interna. Esta camada interna pode dividir-se em duas zonas, externa e interna, com 11,6 e 25,8 nm de espessura, respetivamente, e proporciona alguma rigidez e elasticidade à parede (Barros, 2015).

A parede dos oocistos é contínua com exceção de um dos pólos que é interrompido por uma sutura única que se abre e permite a libertação dos quatro esporozoítos infetantes supracitados. A parede exterior dos oocistos aparenta possuir bastante material glicoproteico e a camada central, de composição lipídica e glicoproteica, confere-lhe um certo grau de rigidez e é responsável pela coloração álcool ácido-resistente característica deste género de protozoários (Fayer, 2008).

O oocisto maduro contém quatro esporozoítos nus e um corpo residual central composto por numerosos pequenos grânulos. Os esporozoítos apresentam-se em forma de banana com um tamanho aproximado de 1 μm e as extremidades anterior e posterior são ligeiramente pontiaguda e redonda, respetivamente (Santín & Trout, 2008). Os oocistos do género *Cryptosporidium* diferenciam-se dos de outras coccídeas pelo facto de não apresentarem micrópilo, nem grânulo polar (Fayer & Ungar, 1986).

Os trofozoítos são formas intracelulares redondas ou ovais com um diâmetro variável entre 2,0 e 2,5 μm . São encontrados dentro de vacúolos parasitóforos formados pelo citoplasma da célula hospedeira e pelo próprio protozoário. Caracterizam-se por possuir um

proeminente nucléolo dentro de um único núcleo com 1,0 a 1,3 μm de diâmetro e pela ausência de complexo apical (Fayer & Ungar, 1986; Fayer, 2008).

Os merozoítos tipo I e tipo II são morfologicamente semelhantes, apresentam forma de crescente com as duas extremidades arredondadas e medem cerca de 5 x 1 μm de diâmetro, contêm um único núcleo, retículo endoplasmático e uma diversidade de grânulos não identificados (Fayer & Ungar, 1986).

Os microgâmetas maduros apresentam-se em forma de cunha com a extremidade anterior achatada, não possuindo flagelo nem mitocôndrias.

As formas jovens dos macrogamontes não se distinguem dos trofozoítos, variando de esféricos a ovais, com um único grande núcleo e nucléolo, retículo endoplasmático, corpos lipídicos e grânulos de amilopectina (Fayer & Ungar, 1986; Fayer, 2008).

Nas figuras abaixo estão representados oocistos de diferentes espécies do gênero *Cryptosporidium* (figura 3) e um esporozoíto do parasita (figura 4).

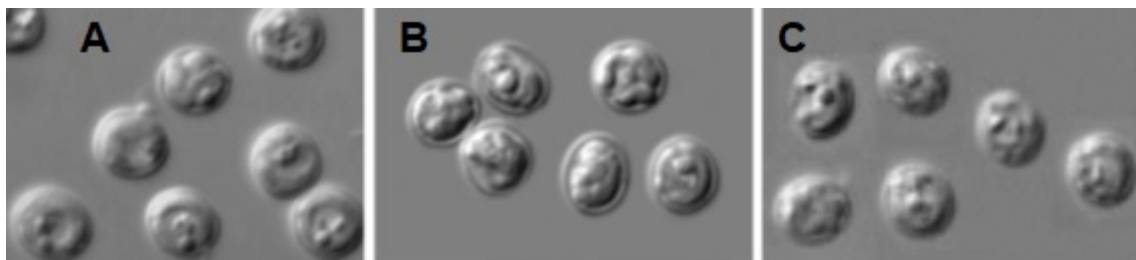


Figura 3. Oocistos de *C. parvum* (A), *C. hominis* (B) e *C. meleagridis* (C) (adaptado de Xiao et al., 2004)

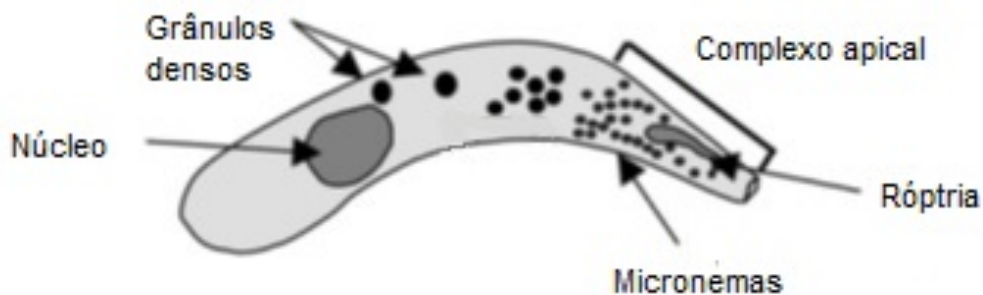


Figura 4. Representação do esporozoíto de *Cryptosporidium* spp. (adaptado de O'Hara & Chen, 2011)

b) *Cryptosporidium* no meio ambiente

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem permanecer viáveis no ambiente durante meses. Quando mantidos a uma temperatura aproximada de 20°C, muitos deles permanecem com capacidade infetante por 6 meses (Fayer, Morgan, & Upton, 2000). Temperaturas elevadas resultam numa quebra da resistência dos oocistos e, consequentemente, numa diminuição do período de viabilidade dos mesmos (Fayer et al., 2000).

A congelação mata os oocistos. A temperaturas na ordem dos -70°C a morte dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* é imediata, mesmo na presença de vários crioprotetores. A temperaturas de congelação menos baixas os oocistos conseguem sobreviver algum tempo, como no caso de temperaturas a rondar os -20°C, às quais conseguem resistir por 8 horas e a -10°C por uma semana. Estes dados sugerem que os fluidos presentes no interior dos oocistos fornecem alguma crioproteção aos esporozoítos (Fayer et al., 2000).

A dessecação é letal para os oocistos de *Cryptosporidium* spp. Estudos demonstraram que apenas 3% dos oocistos se mantinha viável após 2 horas de dessecação e às 4 horas todos se encontravam mortos (Fayer, 2004).

Vários estudos demonstraram que *Cryptosporidium* spp. é capaz de se adaptar a vários tipos de solo e resistir a diversas pressões ambientais, tais como a temperatura e o pH, o que evidencia o seu grande potencial de adaptação e sobrevivência no meio ambiente (Barwick, Mohammed, White, & Bryant, 2003).

Já foi demonstrada a eficácia da radiação ultravioleta em retirar a capacidade infetante aos oocistos de *Cryptosporidium*. Doses de radiação iguais ou inferiores a 10 mJ/cm² resultam numa redução considerável da capacidade infetante dos oocistos (Barros, 2015).

Os oocistos de *C. parvum* apresentam uma resistência significativa à ação da maioria dos desinfetantes comerciais. As concentrações elevadas que são necessárias para diminuir ativamente a capacidade infetante dos oocistos ou são altamente tóxicas ou dispendiosas ou implicam tempos de exposição ao composto impraticáveis (Fayer, 2008).

c) Microbiótoto

Os oocistos do género *Cryptosporidium* têm distribuição ubíqua no ambiente (Xiao et al., 2004).

Segundo Fayer (2000), há inúmeros relatórios à escala global que evidenciam fortemente que a água é um dos fatores de risco elevado para a disseminação da criptosporidiose. Alimentos frescos e água destinada ao consumo humano podem conter os oocistos através de contaminação fecal dos mesmos (Fayer et al., 2000).

Nos hospedeiros, o local primário de infecção pode variar consoante a espécie. *C. parvum* e *C. hominis* infetam primordialmente o intestino delgado, ao passo que *C. andersoni* infeta o estômago do hospedeiro. No caso de *C. baileyi*, a infecção ocorre sobretudo no trato respiratório superior (OIE Terrestrial Manual, 2016).

Em indivíduos, animais e humanos, altamente imunodeprimidos, este protozoário tem sido encontrado em localizações erráticas extraintestinais como, por exemplo, vesícula biliar, fígado e pulmões (Chen et al., 2002 citado por Del Cocco et al., 2009; Fayer et al., 2000).

1.1.4. CICLO DE VIDA

O género *Cryptosporidium* inclui protozoários cujo ciclo de vida, monoxeno, inclui as fases de merogonia, gametogonia e esporogonia (Fayer et al., 2000).

Inicialmente apresentados como parasitas intracelulares, extracitoplasmáticos e obrigatórios, sabe-se hoje que à medida que o protozoário vai completando o seu ciclo este se vai tornando cada vez mais extracelular, refutando a caracterização anterior (Ryan et al., 2016).

Após a ingestão do oocisto infetante, os quatro esporozoítos são libertados e invadem as células epiteliais sobretudo do trato gastrointestinal. O tempo que vai desde a ingestão dos oocistos até à excreção dos mesmos após completado o ciclo – período pré-patente – pode ir de 3/5 dias a 2 semanas (Fayer, 2004).

Em seres humanos ou animais imunocompetentes, o tempo durante o qual há excreção ativa de oocistos – período patente – pode durar uma a várias semanas. Durante este período a presença de oocistos nas fezes é intermitente nos últimos dias (Fayer, 2004).

Em indivíduos imunocomprometidos, ocorre uma infecção crónica que pode persistir durante vários meses (Fayer, 2004).

O número de oocistos excretados por indivíduo no decorrer do período patente é muito variável. Em estudos efetuados, vitelos infetados com 10^5 oocistos chegam a excretar 10^9 a 10^{10} oocistos durante um período de 7 a 10 dias (Fayer, 2004).

Os protozoários *Cryptosporidium* spp. apresentam algumas particularidades importantes que lhes conferem uma grande capacidade de dispersão e que colocam dificuldades no controlo da doença. São elas, o facto de os oocistos serem capazes de libertar os esporozoítos em meios aquosos sem estimulação prévia, possuírem duas etapas capazes de causar autoinfecção – os merontes tipo I e os oocistos de parede fina – e o facto de os oocistos de parede espessa esporulados serem capazes de, ao abandonarem o corpo do hospedeiro, infetar imediatamente outros indivíduos (De Graaf et al., 1999).

Na figura 5 está representado o ciclo de vida da espécie *Cryptosporidium parvum*, segundo Fayer (2008).

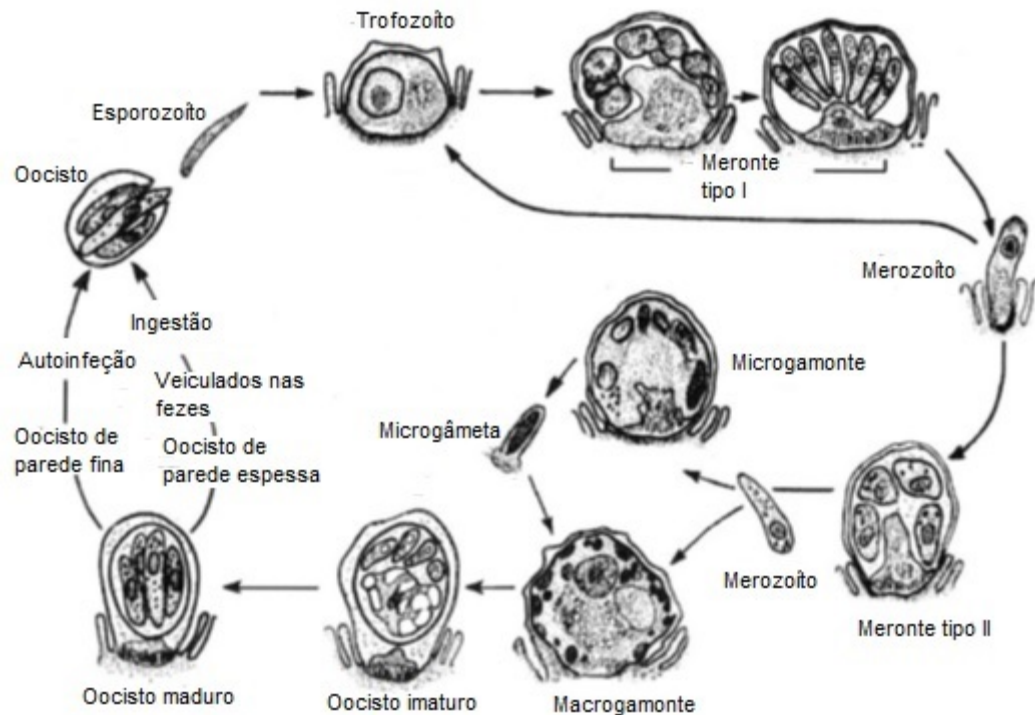


Figura 5. Ciclo de vida do *Cryptosporidium parvum* (adaptado de Fayer, 2008)

a) Desenquistamento

A infecção tem início através da ingestão de oocistos infetantes, provenientes da contaminação fecal ambiental ou diretamente através de um indivíduo já infetado. Dentro do organismo hospedeiro dá-se a abertura da parede do oocisto num dos polos, através do qual os quatro esporozoítos ficam livres e invadem as células epiteliais do trato gastrointestinal do hospedeiro (Rodriguez & Royo, 2001).

b) Invasão celular

Depois do processo de desenquistamento, os esporozoítos que saem dos oocistos aproximam-se do polo apical da célula epitelial e invadem-na ativamente. À medida que o processo de invasão celular progride, os esporozoítos vão adquirindo formas esféricas e passam a designar-se por trofozoítos. Em cultura celular, demonstrou-se que o processo de invasão das células epiteliais do hospedeiro ficava concluído em apenas 15 minutos (Fayer, 2008).

O processo de invasão celular supracitado está esquematizado na figura 6.

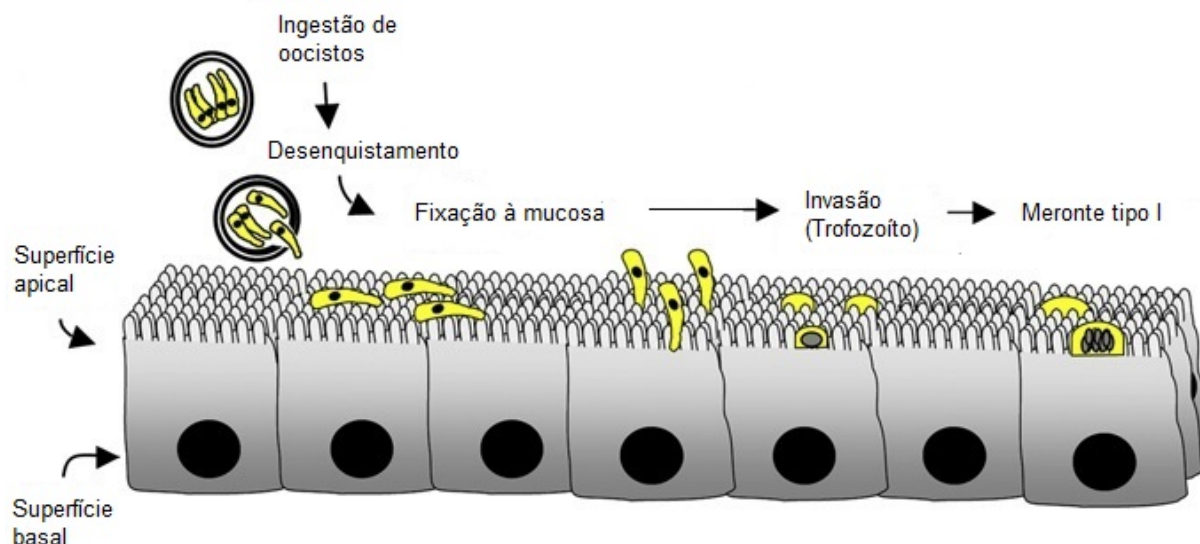


Figura 6. Representação da invasão das células epiteliais do intestino por *Cryptosporidium* spp. (adaptado de O'Hara & Chen, 2011)

c) Multiplicação assexuada

A multiplicação assexuada, também chamada de merogonia, ocorre quando há divisão dos núcleos dos trofozoítos com formação de merontes. No caso do *Cryptosporidium parvum* há dois tipos de merontes, os de tipo I e os de tipo II. Aqui, há diferenças entre espécies, já que no caso de *C. baileyi* há formação de três tipos de merontes como resultado da merogonia (Fayer, 2008).

Os merontes tipo I desenvolvem seis ou oito núcleos, cada um deles incorporado num merozoíto, estágio este que se apresenta morfológicamente semelhante a um esporozoíto. Cada merozoíto maduro, capaz de se diferenciar em outro meronte tipo I ou tipo II, abandona o meronte e procede à infecção de outra célula do hospedeiro (Fayer, 2008). Os merontes tipo II produzem quatro merozoítos (O'Hara & Chen, 2011).

d) Reprodução sexuada

Pensa-se que apenas os merozoítos resultantes dos merontes tipo II tenham a capacidade de iniciar a multiplicação sexual, num processo designado por gametogonia. Nesta fase dá-se a diferenciação destes merozoítos em microgamontes (masculinos) ou em macrogamontes (femininos) (O'Hara & Chen, 2011).

A fase reprodutiva do ciclo deste protozoário vai culminar na formação do zigoto, que originará o oocisto com os esporozoítos infetantes no seu interior (Hemphill et al., 2019).

e) Esporogonia

Os oocistos esporulam *in situ* e, assim que maduros, contêm quatro esporozoítos haplóides. O oocisto esporulado é o único estágio exógeno documentado e aqueles que estão presentes no trato gastrointestinal são eliminados através das fezes, ao invés do que acontece com aqueles que estão alojados no trato respiratório, em que esta é feita através das excreções respiratórias e nasais (Fayer, 2004; Fayer, 2008).

Existe documentação que sugere que os oocistos com paredes finas libertam os seus esporozoítos dentro do organismo do hospedeiro gerando um processo que se intitula de autoinfecção. A maioria, de parede espessa, deixa o corpo do hospedeiro pelas vias supracitadas e dissemina-se no ambiente infetando outros indivíduos (Fayer, 2008).

O processo de autoinfecção diferencia o género *Cryptosporidium* de outras coccídias, já que esta resulta da esporulação *in situ* dos oocistos. Ao invés do que acontece no ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp., outras coccídias libertam oocistos não esporulados no meio ambiente, pelo que estes só se tornam infetantes fora do corpo do hospedeiro (Fayer, 2008).

f) Períodos pré-patente e patente

O período pré-patente varia consoante o hospedeiro, a espécie de *Cryptosporidium* em causa e a dose infetante ingerida (Fayer, 2008).

Estudos demonstram que para *C. parvum* o período pré-patente pode variar entre 2 e 7 dias em vitelos e 4 a 22 dias no Homem e que o período patente pode oscilar entre 1 a 12 dias em vitelos e 1 a 20 dias no Homem (Fayer, 2008).

3.2. EPIDEMIOLOGIA DA CRIPTOSPORIDIOSE

A disseminação de *Cryptosporidium* spp. é facilitada por alguns fatores como, por exemplo, a elevada resistência dos oocistos no meio ambiente, o baixo número necessário para originar a infeção, o seu elevado potencial de multiplicação e a grande variedade de hospedeiros suscetíveis.

3.2.1. DISTRIBUIÇÃO

Os parasitas do género *Cryptosporidium* são de distribuição cosmopolita e segundo alguns estudos serológicos demonstrou-se a presença de anticorpos em 25 a 35% dos habitantes dos países desenvolvidos e em 60-75% dos de países em desenvolvimento. Isto está relacionado com o facto de a presença do parasita variar consoante as características socioeconómicas da área em questão. As infraestruturas de tratamento e eliminação das águas residuais, os alimentos mal lavados, o contacto direto com animais, o estado das canalizações e o acesso a água de qualidade são fatores que condicionam o aparecimento de casos de criptosporidiose humana e animal. São encontrados oocistos nas fezes de 1-3% dos habitantes dos países desenvolvidos (Europa e América do Norte). Estes números aumentam nos continentes asiático e africano com registos de 5% e 10%, respetivamente (Rodriguez & Royo, 2001).

Sabe-se que os bovinos com menos de 30 dias de vida são os mais predispostos à infeção, especialmente em zonas onde este protozoário é endémico. A prevalência de animais infetados pode variar entre os 12 e os 75% por exploração e um estudo recente demonstrou 100% de explorações leiteiras positivas a *Cryptosporidium* na região de Aveiro (Martins et al., 2007). No mesmo estudo, a infeção causada por *Cryptosporidium parvum* foi detetada em 137 de um total de 183 vitelos (74,8%) até às 12 semanas de idade, numa amostragem oriunda de 30 explorações leiteiras com historial de diarreias (Martins et al., 2007; Madeira de Carvalho et al., 2011).

Em ovelhas e cabras as prevalências são mais baixas, variando entre os 10 e os 68% e os 11 e os 35,2%, respetivamente (Barros, 2015).

3.2.2. TRANSMISSÃO

A transmissão de *Cryptosporidium* spp. ocorre através da via fecal-oral, podendo a água e o alimento constituírem fatores preponderantes na disseminação da doença numa população (OIE Terrestrial Manual, 2006). A infeção pode iniciar-se por contacto direto ou indireto, podendo ocorrer de pessoa para pessoa, de animal para animal, de animal para o Homem e vice-versa, através de água ou alimentos contaminados e através de fómites (Fayer et al., 2000).

A espécie *Cryptosporidium parvum* é altamente infecciosa para bovinos jovens e os adultos constituem, muitas vezes, reservatórios da infeção, excretando oocistos para o meio ambiente (OIE Terrestrial Manual, 2016).

Os oocistos têm a capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes frios e húmidos e em fómites como, por exemplo, portões de explorações e utensílios vários. Algumas práticas têm sido associadas à maior disseminação de criptosporidiose como, por exemplo, o parto em recintos fechados e a formação de grupos de neonatos. Estes fatores aumentam o contacto direto entre os animais, sobretudo em idades de elevada suscetibilidade (OIE Terrestrial Manual, 2016).

A prevalência de infeções por *Cryptosporidium* spp. é mais significativa em zonas de elevada densidade populacional. Isto deve-se, na sua grande maioria, à grande oportunidade para a transmissão quer por contacto direto quer por contacto indireto. Esta prevalência é maior em indivíduos jovens, uma vez que são eles os menos adaptados em termos imunológicos e, também, os que são mais propensos à ingestão de matéria fecal. Outros fatores, como a inadequada transferência da imunidade materna passiva, doença concomitante, stress e nutrição desadequada, são também importantes na disseminação e prevalência da criptosporidiose (Olson, 2002).

3.2.3. HOSPEDEIROS

Embora não sejam estritamente específicos, parece haver algum grau de especificidade da maioria das espécies de *Cryptosporidium* em relação aos hospedeiros que infetam. *Cryptosporidium parvum*, o menos específico, já foi detetado em ratos, humanos, bovinos, equinos e em muitos outros. Muitas das espécies que anteriormente se pensava infetarem apenas um hospedeiro revelaram-se, na realidade, zoonóticas, ou seja, para além do hospedeiro principal têm também a capacidade de provocar doença no ser humano. São exemplos disso *C. canis*, que infeta o cão e o Homem, *C. muris*, que infeta o rato e o Homem, entre muitos outros (Fayer, 2004).

Ainda que as infeções por *C. parvum* tenham sido reportadas em 79 espécies de mamíferos, o Homem e os ruminantes continuam a ser os hospedeiros mais afetados pelo parasita (Fayer, Gasbarre, Pasquali, Canals, Almeria & Zarlenga, 1998).

3.2.4. IMPLICAÇÕES NA SAÚDE PÚBLICA

A criptosporidiose é uma das principais causas de diarreia em humanos em todo o Mundo, perdendo apenas para o Rotavírus em termos de frequência (Ryan et al., 2016). Devido à grande variedade de hospedeiros e à disseminação deste parasita no meio ambiente, algumas espécies de *Cryptosporidium*, enquanto zoonóticas, são potencialmente capazes de provocar surtos da doença através de águas e alimentos contaminados. Sabe-se

que as espécies *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum* são as principais responsáveis pelas infecções no Homem (Ryan et al., 2016).

A criptosporidiose humana é, em indivíduos imunocompetentes, uma doença gastrointestinal aguda e auto-limitante, que se manifesta através de sinais clínicos como diarreia aquosa, cólicas, vômitos, febre baixa e perda de apetite. A duração dos sintomas pode ir até às duas semanas com resolução espontânea e sem tratamento. Em indivíduos com graves imunodeficiências a criptosporidiose pode assumir-se crónica e intratável, com elevadas taxas de mortalidade. Esta situação pode ser reportada igualmente em crianças subnutridas e em idosos (Dawson, 2004; Ryan et al., 2016; OIE Terrestrial Manual, 2016).

Os indivíduos que mais facilmente se infetam são aqueles que estão ligados à produção pecuária, particularmente aqueles que contactam diretamente com bovinos jovens. Ainda assim, a transmissão indireta através da água tem sido descrita como a mais importante fonte de infeção do ser humano (Olson, O'Handley, Ralston, McAllister, & Thompson, 2004). A elevada contaminação das águas, a resistência dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. ao tratamento com cloro e seus derivados e a falta de eficácia dos sistemas de filtragem das águas constituem fatores preponderantes para a eclosão de surtos da doença em populações humanas. Todavia, o surgimento destes surtos é influenciado por algumas variáveis como, por exemplo, a densidade populacional, a área geográfica, as práticas agrícolas implementadas e a gestão de resíduos sólidos e líquidos (Joachim, 2004).

Estima-se que o gado bovino constitua a principal fonte de contaminação da água, já que a maioria dos vitelos se encontra infetada e, por isso, excreta oocistos nas fezes, continuando os adultos a fazer o mesmo ao longo da vida (Fayer, 2004).

Um dos maiores surtos de criptosporidiose humana surgiu nos Estados Unidos da América, em 1993. Na cidade norte-americana de Milwaukee, estima-se que o consumo de água contaminada proveniente do Lago Michigan tenha afetado mais de 400 000 pessoas (Mac Kenzie, Hoxie, Proctor, Gradus, Blair, Peterson, Kazmierczak, Addiss, Fox, Rose & Davis, 1994).

No continente europeu, os relatos de infeções causadas por *Cryptosporidium* sp. em humanos são limitados em grande parte pela falta de diagnóstico. Nos países onde foram reportados casos aos órgãos da saúde é possível fazer a estimativa da incidência aproximada. No entanto, e devido à tal falta de diagnóstico, os números reais de casos de criptosporidiose humana podem ser consideravelmente superiores aos apresentados, sendo que, na maioria deles, a origem da infeção permanece desconhecida (Joachim, 2004).

3.3. CRIPTOSPORIDIOSE BOVINA

A criptosporidiose em bovinos foi reportada pela primeira vez na década de 1970 por Panciera et al. (1971) quando o exame histológico ao jejuno de uma novilha de 8 meses de idade com sintomatologia diarreica revelou estádios do parasita (Santín & Trout, 2008). Todavia, o seu papel foi negligenciado até 1980, altura em que Tzipori, Campbell, Sherwood, Snodgrass e Whitelaw (1980) concluíram que *Cryptosporidium* spp. seria a causa principal de um surto de diarreia neonatal em bovinos (De Graaf et al., 1999).

A criptosporidiose é responsável por grandes prejuízos económicos, relacionados com a diarreia. Desidratação, atraso no crescimento e mortalidade são alguns dos pontos críticos que surgem em consequência da doença e que obrigam os produtores a direcionar capital com vista à resolução do problema. Administração oral de soluções eletrolíticas, fluidoterapia endovenosa e administração de outros fármacos são alguns dos alicerces do tratamento das diarreias neonatais (De Graaf et al., 1999).

Inicialmente, através da identificação microscópica de oocistos, foram identificadas duas espécies: *C. parvum* e *C. muris*, infetando o intestino e o abomaso dos animais, respetivamente (Panciera et al., 1971; Anderson, 1987; citados por Santín & Trout, 2008). Após aplicação de técnicas moleculares, a espécie *C. muris* foi corretamente identificada como *C. andersoni* (Lindsay et al., 2000, citado por Santín & Trout, 2008).

Cryptosporidium parvum é o agente mais comumente encontrado nas fezes de vitelos durante as primeiras semanas de vida agindo sozinho ou acompanhado por outros agentes patogénicos (rotavírus, coronavírus, *E. coli*, etc) que potenciam a gravidade da infeção (De Graaf et al., 1999).

3.3.1. ESPÉCIES QUE PARASITAM OS BOVINOS

Os hospedeiros mais atingidos pelo parasita e amplamente reconhecidos como hospedeiros preferenciais, para além do Homem, são os ruminantes. De todas as espécies examinadas de ruminantes domésticos e selvagens, *Bos taurus*, que abrange todas as raças europeias de gado doméstico, é aquele que foi estudado mais minuciosamente com cerca de 400 referências até ao final da década de 1990. A prevalência da infeção por *C. parvum* em vitelos pré-desmamados é elevadíssima. Quando se procedeu à análise fecal de animais entre os 3 e os 6 dias de vida, duas vezes por semana durante o período de um mês, concluiu-se que 93% de 42 vitelos não medicados se encontravam infetados (Fayer et al., 1998).

Nos bovinos são encontradas frequentemente quatro espécies de *Cryptosporidium*: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni*, sendo que apenas *Cryptosporidium parvum* está

associado à ocorrência de doença clínica em vitelos recém-nascidos. Os animais mais velhos (>6 semanas de vida) constituem-se como excretadores assintomáticos de oocistos. Há uma tendência na distribuição das diferentes espécies de *Cryptosporidium* consoante a idade do hospedeiro (Thomson, Hamilton, Hope, Katzer, Mabbott, Morrison & Innes, 2017).

Cryptosporidium andersoni, com oocistos de dimensões médias de 7,4 x 5,5 µm (OIE Terrestrial Manual, 2016), é mais frequentemente isolado nas fezes de vitelos desmamados, novilhos e adultos e afeta o abomaso dos animais. Os sinais clínicos associados à infeção por *C. andersoni* incluem uma redução no ganho de peso e na produção leiteira em vacas adultas (Thomson et al., 2017).

Cryptosporidium bovis, identificado como *Cryptosporidium* genótipo bovino B (Xiao et al., 2002, citado por Fayer, 2010), apresenta oocistos com dimensões médias de 4,9 x 4,6 µm (OIE Terrestrial Manual, 2016) e afeta vitelos com idades compreendidas entre os 2 e os 11 meses (Fayer, Santín, Trout, & Greiner, 2005). Não está associado a sinais clínicos entéricos, nem lhe é reconhecido potencial zoonótico (Santín & Trout, 2008).

Cryptosporidium ryanae foi inicialmente identificado como *Cryptosporidium* genótipo *deer-like*. Apesar de nunca ter sido isolado nas fezes de cervídeos, a sua sequência SSU rRNA apresenta-se muito similar à do genótipo daquele grupo de animais (Fayer, Santín & Trout, 2008; Fayer, 2010). Esta espécie parasita o intestino delgado do hospedeiro e não é causadora de sinais clínicos. Os oocistos desta espécie são os de menores dimensões em mamíferos, 3,7 x 3,2 µm (OIE Terrestrial Manual, 2016), e, por esse motivo, nem todos os esporozoítos são facilmente identificáveis dentro dos oocistos (Fayer, 2010). Em estudos conduzidos nos Estados Unidos da América, constatou-se que cerca de 3,8% dos bovinos leiteiros estariam infetados por *C. ryanae*, não sendo conhecidos outros hospedeiros (Fayer, 2010).

Cryptosporidium parvum é a principal espécie responsável por afeções entéricas nos bovinos, colonizando o íleo e as porções proximais do intestino grosso dos animais. Os seus oocistos apresentam dimensões médias de 5,0 x 4,5 µm (OIE Terrestrial Manual, 2016). *C. parvum* afeta largamente os vitelos entre as duas e as três semanas de vida, com possibilidade de excreção de oocistos logo a partir dos três dias, e é causador de diarreias aquosas profusas, inapetência, letargia e desidratação (Thomson et al., 2017).

3.3.2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os parasitas do género *Cryptosporidium* possuem características que favorecem a perpetuação da doença nos bovinos como, por exemplo, a baixa quantidade de oocistos necessária para despoletar a infeção (Joachim, 2004), o facto dos animais infetados serem

excretadores de enormes quantidades de oocistos que vão contaminar o ambiente e continuar o ciclo da doença (Smith, Cacciò, Cook, Nichols, & Tait, 2007), a elevada resistência dos oocistos que podem sobreviver durante períodos de 6 meses a temperaturas de 20°C (Fayer et al., 2000) e em diferentes tipos de solo, demonstrando por isso, um enorme potencial adaptativo (Barwick et al., 2003), a transmissão zoonótica através de indivíduos infetados ou através de água e alimento contaminados e o facto de não haver um tratamento eficaz no combate a este protozoário (Smith et al., 2007).

Foi demonstrado que vitelos com menos de 30 dias de vida constituem o grupo de maior risco à infeção. De facto, vitelos infetados podem excretar entre 4×10^6 e $4,15 \times 10^7$ oocistos nas fezes e, assim, contaminar solos, águas e outros indivíduos (Madeira de Carvalho et al., 2011).

O maneio da exploração é um ponto crucial no controlo de *Cryptosporidium*. Assim, fatores como o tamanho da vacada e a presença de animais que não gado bovino na exploração influenciam a dinâmica da infeção. A altura do ano também é um fator relevante, já que um estudo em bovinos de carne realizado no Canadá demonstrou uma maior prevalência de infeções no inverno e na primavera, alturas com maior número de partos nas explorações e, dessa forma, com um número mais elevado de vitelos dentro da faixa etária de maior risco de infeção (Madeira de Carvalho et al., 2011; De Graaf et al., 1999).

3.3.3. DISTRIBUIÇÃO E PREVALÊNCIA DA DOENÇA

São vários os estudos que apontam a idade dos animais como fator chave na infeção por protozoários do género *Cryptosporidium*. Embora a criptosporidiose possa afetar bovinos de diversas faixas etárias, é descrita uma elevada prevalência em animais antes do desmame. A prevalência da doença demonstra uma relação inversamente proporcional à idade, diminuindo bastante em vitelos pós-desmame, novilhos e adultos. Vitelos com idades inferiores a dois meses são infetados sobretudo por *C. parvum*, sendo esta espécie responsável por cerca de 85% das infeções nos animais desta faixa etária, enquanto que os animais mais velhos são, muitas vezes, infetados por espécies como *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni* (Fayer et al., 2005; Couto & Bomfim, 2013).

Num estudo realizado por Santín, Trout e Fayer (2008), em Maryland, Estados Unidos da América, foram recolhidas amostras fecais de 30 vitelos desde o nascimento até aos 24 meses de idade. Concluiu-se que o pico da infeção terá ocorrido às duas semanas de vida, altura em que 29 dos 30 vitelos estavam a excretar oocistos do género *Cryptosporidium*. A prevalência demonstrou ser mais elevada em vitelos antes do desmame (1-8 semanas de vida), sendo seguida por animais desmamados (3-12 meses de vida) e novilhos (12-24 meses

de vida). Neste estudo, a prevalência cumulativa para as diferentes espécies de *Cryptosporidium* identificadas foi de 100%, 80%, 60% e 3,3% para *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni*, respetivamente. *Cryptosporidium parvum* foi detetado em 24 de 30 vitelos quando estes tinham apenas uma semana de vida e em 29 de 30 quando tinham duas semanas de vida. Após as 10 semanas de vida apenas dois vitelos se demonstraram infetados por esta espécie do parasita, o que demonstra, uma vez mais, a relação inversa do parasitismo por *C. parvum* com a idade dos animais. A primeira deteção de *C. bovis* e *C. ryanae* ocorreu às 4 e às 10 semanas de idade, respetivamente. As prevalências destas duas espécies atingiram os seus máximos às 16 (*C. bovis*) e às 18 (*C. ryanae*) semanas de vida. A esmagadora maioria das infeções causadas por *Cryptosporidium bovis* foram registadas desde os 3 aos 14 meses de idade, com exceção de três animais que se infetaram com esta espécie antes deste período. No caso do *Cryptosporidium ryanae*, os registos dão conta de infeções quando os animais estavam em idades compreendidas entre as 3,5 e os 6 meses de idade, com apenas três animais com historial de infeção por *C. ryanae* após este período. *Cryptosporidium andersoni* apenas foi isolado a partir dos 19 meses de idade, tendo sido encontrado em dois meses consecutivos no mesmo animal. A conclusão que foi tirada a partir deste estudo prende-se com a grande prevalência de infeções por *C. parvum* no período antes do desmame, ao contrário do que acontece em animais desmamados e novilhas que são mais afetados por *C. bovis* e *C. ryanae*. *C. andersoni* apenas foi isolado nas fezes de novilhas, constituindo 25% das infeções nesta faixa etária (Santín, Trout & Fayer, 2008).

A figura 7 faz referência ao estudo supracitado relativamente à prevalência de diversas espécies do género *Cryptosporidium* isoladas em vitelos desde a primeira semana de vida até aos dois anos.

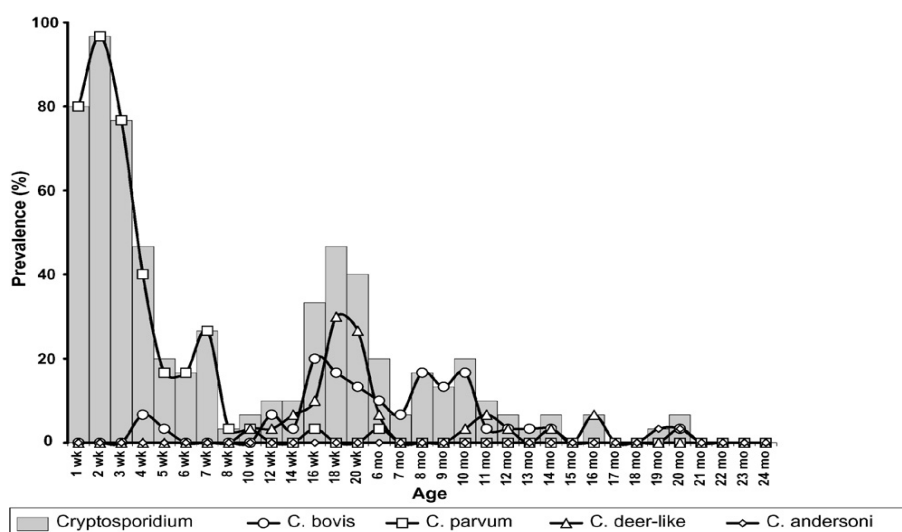


Figura 7. Estudo longitudinal de prevalência em Maryland (EUA) de *Cryptosporidium* spp., *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* e *C. ryanae* em vitelos acompanhados desde a primeira semana de vida até aos 24 meses de idade (Santín et al., 2008)

No panorama nacional, num estudo levado a cabo na região norte de Portugal com uma amostragem de 291 vitelos e 176 bovinos adultos, estimou-se uma infeção por *Cryptosporidium* spp. de 25,4% nos vitelos e de 4,5% em adultos, tendo sido demonstrado através de caracterização molecular que os isolados seriam todos de *C. parvum* (Mendonça, Almeida, Castro, Delgado, Soares, Costa & Canada, 2007). De um outro estudo realizado no noroeste de Portugal saiu uma prevalência de 74,8% em vitelos até três meses de vida e constatou-se que os níveis de excreção de oocistos teria sido mais elevado em vitelos com idades compreendidas entre os 7 e os 14 dias e entre os 15 e os 21 dias, com percentagens de 89% e 90%, respetivamente (Martins et al., 2007). Num outro estudo realizado nas regiões do Alentejo e do Ribatejo e Oeste foi reportada uma prevalência global de 23,3% de animais positivos ao *Cryptosporidium* spp., com 21,1% no Alentejo e 34% no Ribatejo e Oeste (Pereira da Fonseca, 2000). Nos Açores, Barros (2015) registou uma prevalência de 31,2% de animais positivos numa amostragem de 250 vitelos oriundos de explorações leiteiras da Ilha Terceira.

3.3.4. TRANSMISSÃO DE *Cryptosporidium* spp. NOS BOVINOS

Os oocistos do género *Cryptosporidium*, que constituem os estádios infetantes do parasita, utilizam a via fecal-oral como via de transmissão da doença. Esta transmissão pode ocorrer direta ou indiretamente (Fayer et al., 2000).

a) Transmissão direta

Esta forma de transmissão de *Cryptosporidium* ocorre através do contacto direto entre indivíduos infetados e indivíduos suscetíveis à infeção (Fayer et al., 2000; OIE Terrestrial Manual, 2016).

b) Transmissão indireta

Esta forma de transmissão pode despoletar novos casos infecciosos por intermédio de fómites como, por exemplo, veículos e instrumentos vários (OIE Terrestrial Manual, 2016).

Muitos dos surtos associados à criptosporidiose são consequência de contaminação massiva das águas e alimentos (OIE Terrestrial Manual, 2016). A contaminação fecal dos solos e águas superficiais pode conduzir à contaminação de matérias-primas utilizadas na alimentação dos animais e, consequentemente, causar infeção nesses animais. As fezes contendo oocistos esporulados de *Cryptosporidium* spp. podem ser transportados pelo vento, água e, em alguns casos, por pássaros ou artrópodes (Fayer et al., 2000).

3.3.5. FATORES DE RISCO

São vários os fatores passíveis de aumentar o risco de aparecimento de criptosporidiose numa exploração bovina.

a) Dimensão do efetivo

Segundo Garber et al. (1994) o número de animais é um fator de risco importante nas explorações. Explorações com mais animais estão mais predispostas a ter vitelos infetados com *Cryptosporidium parvum*. Grandes vacadas podem apresentar cargas parasitárias mais elevadas devido à maior concentração animal ou até ao menor tempo de repouso das pastagens impedindo a depleção natural de organismos patogénicos e estimulando, assim, a excreção continuada de oocistos para o solo (Bouzid, Kintz, & Hunter, 2018; Garber, Salman, Hurd, Keefe & Schlater, 1994).

b) Idade

Vários autores defendem que a faixa etária compreendida entre os 8 e os 21 dias é a fase mais crítica para as infeções por *Cryptosporidium*, tendo um estudo realizado por Duranti et al. (2009) revelado que a prevalência máxima da infeção em vitelos foi registada nos primeiros 10 dias após o nascimento (Duranti, Cacciò, Pozio, Di Egidio, De Curtis, Battisti & Scara, 2009).

Num estudo conduzido por Garber et al. (1994) foi demonstrado que a percentagem de vitelos com idades compreendidas entre as 1 e 3 semanas de vida que estariam a excretar oocistos era de 48,1% (773 em 1607 vitelos) e constituía a faixa etária mais afetada pela doença. Outras faixas etárias apresentaram menos animais em excreção de oocistos, com apenas 21,9% de vitelos positivos com idades compreendidas entre as 3 e as 5 semanas de vida e menos de 15% no grupo de vitelos com mais de 5 semanas de idade. Constatou-se igualmente que apenas 2,5% dos vitelos com menos de 4 dias de vida acusaram positivo no teste de imunofluorescência. Este resultado vai ao encontro das características do ciclo de vida do parasita, já que são necessários alguns dias desde o momento da infeção até que a excreção de oocistos se inicie (Garber et al., 1994).

Um estudo de prevalência realizado na região de Aveiro por Martins et al. (2007) revelou que a percentagem mais elevada de oocistos excretados foi registada em vitelos com idades compreendidas entre os 7 e os 14 dias (89%) e entre os 15 e os 21 dias (90%) (Martins et al., 2007; Madeira de Carvalho et al., 2011).

c) Tipo de exploração

Segundo Duranti et al. (2009) foi demonstrada uma relação significativa entre a ocorrência de criptosporidiose bovina e o tipo de exploração. Nesse estudo constatou-se que as prevalências da doença em explorações de leite e carne eram de 32,7% e 3,1%, respetivamente. Estes resultados surgem como consequência do maior contacto entre jovens e adultos nas explorações de carne que, segundo os autores, faz diminuir o risco de infeção. Assim, os autores concluíram que explorações de produção de carne bovina, onde os vitelos são mantidos com as mães, apresentam 61 vezes menos probabilidade de aparecimento de casos de criptosporidiose (Duranti et al., 2009).

Pereira da Fonseca (2000) refere que a produção intensiva, que concentra um número elevado de vitelos recém-nascidos, favorece o aparecimento da doença por contacto direto com animais doentes ou com portadores assintomáticos, com eliminação prolongada de oocistos e contaminação ambiental. Este ciclo de infeção explica a razão pela qual existe uma maior prevalência da doença em explorações leiteiras quando comparadas com as de carne.

d) Sazonalidade e época de partos

Segundo Garber et al. (1994) as estações do ano têm também um impacto significativo na ocorrência da doença. Os autores, citando um estudo canadiano em vacas de carne, referem que a prevalência de parasitas do género *Cryptosporidium* demonstrou ser mais elevada nos meses de Inverno e Primavera, o que se explica pelo facto de, nos animais com esta aptidão, os partos estarem mais concentrados nestes meses do ano e, desta forma, haver um número mais elevado de vitelos dentro do grupo de maior risco (1 a 3 semanas de vida) quando comparado com o resto do ano. O verdadeiro efeito da sazonalidade será menos evidente em explorações leiteiras já que os partos se encontram distribuídos ao longo do ano e, por isso, há constantemente vitelos com idades críticas (Garber et al., 1994).

e) Qualidade da água de bebida

A qualidade da água de abastecimento é considerada um fator de risco importante dada a facilidade que o protozoário tem em disseminar-se através dela. São vários os relatos à escala mundial que documentam que a água contaminada desempenha um papel importantíssimo na disseminação da criptosporidiose e na génese de surtos da doença (Fayer et al., 2000; Smith et al., 2007). Num estudo conduzido em Portugal por Pereira da Fonseca

(2000) foi obtida uma prevalência de 55% na pesquisa de oocistos em amostras de água de bebida fornecida aos animais.

f) Infecções concomitantes

Vários estudos foram realizados com o intuito de determinar a importância dos agentes patogênicos mais comumente associados ao aparecimento de diarreias neonatais bovinas. Em todos eles rotavírus e *Cryptosporidium parvum* estão significativamente associados à ocorrência de diarreia, sendo que *C. parvum* constitui, como agente único ou em associação com outros agentes, o principal causador de diarreias em vitelos. Mais recentemente demonstrou-se também a associação de *Giardia* spp. no aparecimento de diarreias neonatais (Madeira de Carvalho et al., 2011). Outros agentes etiológicos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, coronavírus e o vírus da diarreia viral bovina (BVD) são reconhecidos como importantes agentes enteropatogênicos da diarreia nos vitelos (Madeira de Carvalho et al., 2011; Martins et al., 2007).

3.3.6. PATOGENIA

Atendendo ao grupo alvo da presente dissertação, daremos mais ênfase à espécie *Cryptosporidium parvum*.

As infecções ocorrem majoritariamente no intestino delgado do hospedeiro mas, em alguns casos, já têm sido detectadas lesões no ceco e no cólon dos animais doentes (De Graaf et al., 1999).

Histologicamente, este parasita invade e coloniza a superfície epitelial do intestino delgado do hospedeiro, o que origina depleção de células epiteliais e da bordadura em escova das microvilosidades, hiperplasia das criptas e alterações inflamatórias na lâmina própria com presença de linfócitos, neutrófilos, plasmócitos e macrófagos (Rodriguez & Royo, 2001). As junções epiteliais são danificadas, o que conduz ao aumento da permeabilidade epitelial e, conseqüentemente, há uma diminuição da área de superfície de absorção do intestino, perda de enzimas digestivas e um deficiente aporte de nutrientes e eletrólitos.

Além destas alterações, o parasita tem a capacidade de produzir uma toxina semelhante à da cólera que pode estar igualmente envolvida na gênese da diarreia. Segundo O'Handley & Olson (2006), *Cryptosporidium* spp. poderá induzir também apoptose celular e interferir na junção epitelial, culminando na perda de função de barreira. Todas estas alterações vão desencadear o aparecimento do sinal clínico mais característico desta afeição, uma diarreia amarelada por deficiente absorção.

3.3.7. SINAIS CLÍNICOS

A criptosporidiose clínica pode ser observada em vitelos com idades compreendidas entre os 7 e os 30 dias de vida, com duração de 4 a 14 dias. Os sinais clínicos associados à criptosporidiose intestinal são resultado da combinação da deficiente absorção e do aumento da secreção de fluidos. No entanto, a gravidade e a duração podem ser altamente variáveis. A diarreia, amarela pálida com muco, pode ser leve a grave e pode persistir até duas semanas. Os vitelos apresentam geralmente letargia, anorexia e desidratação. Em casos mais graves os vitelos chegam mesmo a morrer em consequência da desidratação grave e colapso cardiovascular associados à causa primária. A gravidade da doença e as suas manifestações clínicas podem ser influenciadas por numerosos fatores como, por exemplo, a dose infetante, o estado imunitário do efetivo, a presença de doenças concomitantes e a nutrição dos animais. Vitelos com quadros mais graves da doença podem levar 4 a 6 semanas a recuperar, tendo a afeção repercussões produtivas no que respeita à perda de peso ou à diminuição do ganho médio diário (O'Handley & Olson, 2006; Olson et al., 2004; OIE Terrestrial Manual, 2016).

A taxa de mortalidade associada à doença é bastante variável sendo que, em efetivos onde o parasita é endémico, a taxa de morbilidade pode atingir os 100% (De Graaf et al., 1999; Santín & Trout, 2008). A mortalidade não é frequentemente observada, já que a infeção por *Cryptosporidium* sp. é geralmente auto-limitante (O'Handley & Olson, 2006).

As infeções causadas por *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae* não têm sido associadas ao aparecimento de sinais clínicos (Fayer, Santín, Trout & Greiner, 2005; Fayer et al., 2008; O'Handley & Olson, 2006; Olson et al., 2004).

3.3.8. FISIOPATOLOGIA DA DIARREIA

A infeção causada por parasitas do género *Cryptosporidium* induz uma atrofia significativa das vilosidades intestinais em vitelos e animais de outras espécies pecuárias. Esta atrofia é causada pela perda de enterócitos e a subsequente retração das vilosidades numa tentativa de manter uma barreira epitelial contínua. A hiperplasia da cripta surge igualmente de forma a compensar a depleção de células epiteliais. Apesar de serem conhecidas as consequências da infeção por *Cryptosporidium* sp., o mecanismo preciso que conduz à perda de células epiteliais ainda não é totalmente conhecido, não sendo claro se essa perda celular constitui um efeito patogénico ou se faz parte da resposta do organismo do hospedeiro numa tentativa de combater a infeção (Foster & Smith, 2009; Wyatt, Riggs, & Fayer, 2010).

São conhecidos dois mecanismos que conduzem à perda de células epiteliais em infeções provocadas por *C. parvum*. Um deles é o efeito citotóxico do organismo na mucosa

intestinal e o outro, o mais provável, é a apoptose. Pesquisas apontam para que a ativação e inativação da apoptose estejam relacionadas com o estágio do ciclo de vida do parasita. Assim, a apoptose é inibida durante a fase de trofozoíto, estágio em que o organismo é mais dependente do hospedeiro, sendo ativada numa fase mais adiantada da infecção (Foster & Smith, 2009; Wyatt et al., 2010).

Independentemente do mecanismo que conduz à perda de células epiteliais a consequência é sempre o aparecimento de diarreia por má absorção. A absorção de fluidos diminui drasticamente devido à perda de células epiteliais e diminuição da área de superfície das vilosidades intestinais (Foster & Smith, 2009; Wyatt et al., 2010). As diferenças de área de superfície das vilosidades intestinais estão bem patentes na figura 8.

A perda de células epiteliais, a atrofia das vilosidades intestinais e a consequente má absorção não são, no entanto, responsáveis por todo o fluido perdido observado em infecções por *C. parvum*. De facto, estudos apontam para a existência de um mecanismo mediado pela síntese de prostaglandinas com secreção de Cl^- e HCO_3^- e inibição de NaCl pelas vilosidades intestinais, o que contribui para o aparecimento da diarreia e perda de fluidos (Foster & Smith, 2009; Wyatt et al., 2010).

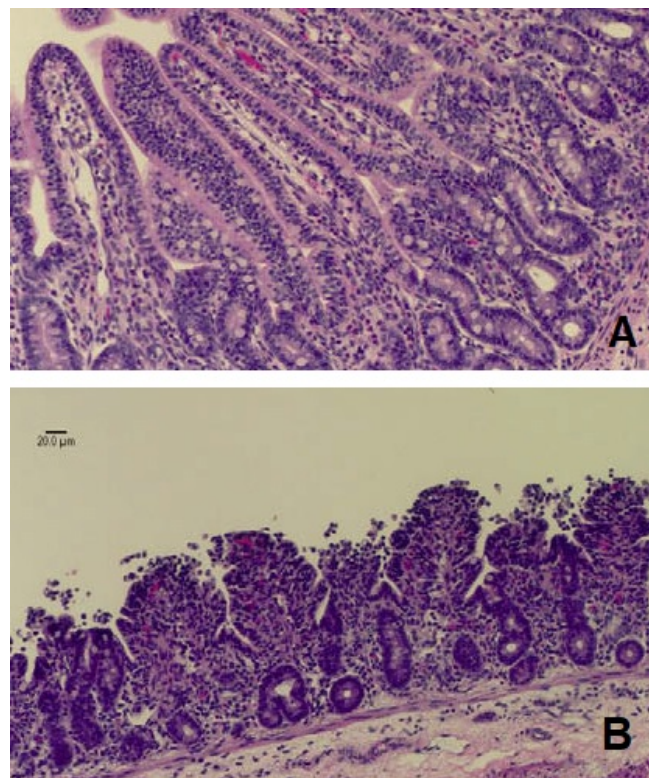


Figura 8. Mucosa do íleo de um vitelo saudável (A) e de um vitelo infetado por *C. parvum* (B) (adaptado de Foster & Smith, 2009)

3.3.9. RESPOSTAS IMUNITÁRIAS À INFEÇÃO POR *Cryptosporidium* spp.

As respostas imunitárias do hospedeiro face à presença de um organismo estranho derivam de mecanismos das imunidades inata e adquirida.

A imunidade inata consiste num conjunto de defesas que se caracteriza por uma secreção contínua de inibidores ou por respostas imediatas, ou a curto prazo, mediadas por células. Em vitelos, a flora intestinal adquirida após o nascimento tem sido sugerida como fator importante no combate à infeção por *Cryptosporidium* sp. na medida em que compete com o parasita pela fixação às células epiteliais do intestino. Esta imunidade é, no entanto, insuficiente para travar e eliminar a infeção por *C. parvum* (Wyatt et al., 2010).

A imunidade adquirida, estabelecida através da vacinação ou recuperação de uma infeção prévia, apresenta três características relevantes: a sua longa duração, o facto de promover o desenvolvimento de linfócitos de memória antigénio específicos e ainda o facto de apresentar especificidade para o agente patogénico que a desencadeou. Este tipo de imunidade inclui as respostas humoral e celular, que são geradas pelos vitelos após exposição a *Cryptosporidium parvum* (Wyatt et al., 2010).

a) Imunidade humoral

Os anticorpos circulantes podem ser encontrados em vitelos após o término da excreção de oocistos. Estes anticorpos têm a capacidade de se ligarem a vários antigénios de *C. parvum*. Estudos experimentais demonstraram que vitelos de vacas imunizadas com a proteína recombinante p23 aos quais foi administrado colostro hiperimune apresentavam níveis de excreção de oocistos inferiores e ficaram protegidos contra a doença, realçando o papel protetor dos anticorpos neutralizantes contra a criptosporidiose. Os anticorpos libertados no lúmen intestinal podem ser excretados nas fezes dos vitelos e estudos em que foi utilizada a proteína recombinante p23 detetaram a presença de anticorpos anti-p23 nas fezes dos vitelos clinicamente normais e sem excreção de oocistos. O colostro ingerido pelos animais continha igualmente anticorpos anti-p23, com títulos semelhantes aos observados nas amostras fecais correspondentes. Este achado sugere que os anticorpos encontrados nas fezes dos animais seriam o resultado da transferência passiva de anticorpos (Wyatt et al., 2010).

As presenças de IgA, IgM e IgG já foram detetadas no soro de vitelos. Estes anticorpos aparecem cerca de 5 a 8 dias após a infeção, atingindo títulos máximos por volta dos 8 a 15 dias. A resposta imunológica, por IgA e IgM, tem a duração de poucas semanas, enquanto que IgG tem a capacidade de persistir no organismo por vários meses. O papel destas

imunoglobulinas não é totalmente claro, ainda que o aumento dos níveis de anticorpos fecais coincida com a diminuição da excreção de oocistos (Pereira da Fonseca, 2000).

A transferência de imunidade passiva parece ter importância profilática na criptosporidiose bovina. Estudos efetuados demonstraram que alguns anticorpos monoclonais tinham a capacidade de inibir a fixação dos esporozoítos e a invasão celular, reduzindo a capacidade infetante do parasita. À margem disto, é desconhecida a eficácia destes anticorpos contra estádios de desenvolvimento intracelular, dentro dos vacúolos parasitóforos e envolvidos pelas membranas hospedeiras. O curto período de sobrevivência dos anticorpos e a excreção aumentada em casos de diarreia são fatores limitantes à eficácia dos anticorpos no intestino (Pereira da Fonseca, 2000).

b) Imunidade celular

Os linfócitos T são importantes nas respostas imunitárias adaptativas e dividem-se em duas subclasses: CD4⁺ e CD8⁺. Os linfócitos T CD4⁺, mediadores Th1, promovem a diferenciação dos linfócitos T CD8⁺ em linfócitos T citotóxicos cuja função é matar as células infetadas. Em estudos experimentais, onde foi feita a infeção *in vitro* de explantes de íleo de vitelos recém-nascidos, provou-se a presença de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em torno de células epiteliais dos explantes nos quais foram inoculados oocistos de *Cryptosporidium* sp. 24 horas antes da pesquisa demonstrando, dessa forma, a capacidade de resposta das células T à infeção por *C. parvum*. Uma análise semelhante ao íleo de vitelos, desta vez infetados com *C. parvum* três dias antes, revelou a presença dos mesmos linfócitos nas vilosidades, lâmina própria e placas de Peyer, em quantidades muito superiores às encontradas no mesmo tecido de vitelos não infetados (Pereira da Fonseca, 2000; Wyatt et al., 2010).

Vitelos infetados há 3 dias não exibem, normalmente, sinais clínicos de criptosporidiose, nem iniciaram ainda a excreção de oocistos. Assim, estes estudos indicam-nos que a resposta imunitária começa no intestino antes do início da diarreia. Animais a recuperar de uma criptosporidiose, com paragem das fezes diarreicas 24 a 48 horas antes, apresentaram respostas imunitárias compatíveis com o desenvolvimento de imunidade à doença (Wyatt et al., 2010).

Uma resposta imunitária efetiva na mucosa intestinal, que compreende a produção de anticorpos e a capacidade de resposta das células T, está, deste modo, associada à recuperação da doença em vitelos e à capacidade de reconhecimento e combate do *Cryptosporidium* num cenário de nova exposição ao agente (Wyatt et al., 2010).

3.3.10. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. pode ser feito segundo duas vertentes: clínica e laboratorial. A sua realização com base na clínica é, no entanto, insatisfatória, já que os sinais clínicos da criptosporidiose são inespecíficos e podem, por isso, ser associados a diversas doenças. As manifestações clínicas variam de acordo com vários fatores como, por exemplo, os estados nutricional e imunitário do animal, a gravidade da infeção e até mesmo a espécie do parasita. Desta forma, as técnicas laboratoriais são essenciais no diagnóstico definitivo da doença (Pereira da Fonseca, 2000).

a) Detecção do parasita

O método mais utilizado no diagnóstico de parasitas do género *Cryptosporidium* continua a ser a observação microscópica de oocistos em esfregaços fecais (O'Handley & Olson, 2006). Os esfregaços são secos, fixados e corados e, posteriormente, observados com as objetivas de 40x e 100x (objetiva de imersão). Apesar de ser o método menos sensível e preciso, continua a ser o mais usado devido à sua rapidez, baixo custo e fácil deteção do agente quando a infeção é grave (Wyatt et al., 2010).

Estão descritas algumas técnicas de coloração como, por exemplo, pelos métodos de Giemsa, por Gram, pelo azul de metileno, pela safranina, com fluocromos e pelo Ziehl-Neelsen. As colorações podem ser feitas em material fresco ou fixado, sendo que a fixação previne a contaminação accidental do esfregaço. Uma das técnicas mais utilizadas é a coloração por Ziehl-Neelsen modificada que se baseia nas propriedades álcool-ácido-resistentes dos oocistos de *Cryptosporidium*. Esta técnica evidencia a morfologia do oocisto e permite a sua medição. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp., apresentados na figura 9, são pequenos e são excretados intermitentemente, o que faz com que se recorra a várias técnicas de concentração, coloração e marcação imunológica, que se destinam sobretudo a amostras com baixo número de oocistos (Pereira da Fonseca, 2000).

Colorações negativas como, por exemplo, a técnica de acetato de uranil e técnicas de concentração podem tornar-se úteis mas apresentam alguma dificuldade de interpretação nos casos de infeções ligeiras (Pereira da Fonseca, 2000).

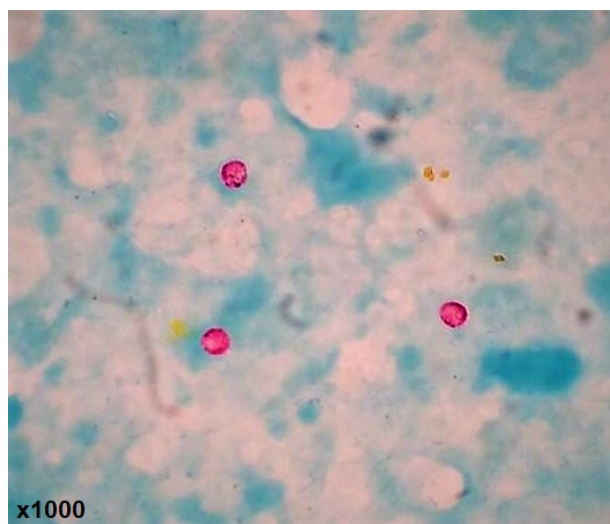


Figura 9. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. corados com Ziehl-Neelsen modificada (original)

b) Detecção de antígeno

Existem vários “kits” para a realização de técnicas imunoenzimáticas (ELISA) que usam anticorpos mono e policlonais e que permitem a detecção de oocistos em amostras de fezes e que possibilitam a identificação de animais com criptosporidiose sem excreção ativa de oocistos na altura da colheita da amostra. O método ELISA apresenta sensibilidade e especificidade mais elevadas quando comparadas com as dos métodos supracitados, com 82,3% e 96,7%, respetivamente, para detecção de antígenos do parasita nas fezes humanas (Pereira da Fonseca, 2000).

A técnica de imunofluorescência utiliza anticorpos monoclonais fluorescentes e, à semelhança do que ocorre no método ELISA, tem a capacidade de reconhecimento de epítomos na superfície dos oocistos e permite a visualização dos parasitas intactos. Investigadores utilizam estas técnicas de imunofluorescência como “gold standard” para avaliarem a sensibilidade e especificidade de outros métodos rápidos de detecção de oocistos (Pereira da Fonseca, 2000; Ahmed & Karanis, 2018).

Atualmente, existem ainda os chamados “testes rápidos” que se constituem como testes imunocromatográficos e que podem ser utilizados no campo pelo médico veterinário permitindo a detecção de antígenos de *Cryptosporidium* em amostras de fezes com grande rapidez (Barros, 2015).

c) Detecção de anticorpos

Testes imunológicos como ELISA, Western-Blot e técnicas de imunofluorescência têm vindo a ser utilizados na detecção de anticorpos séricos específicos contra *Cryptosporidium*. A detecção destes anticorpos não deve ser, porém, encarada como indício de infeção ativa, mas

sim como evidência de uma possível exposição prévia ao parasita. Na maioria dos casos, a presença de anticorpos é detetada apenas quando já existe excreção de oocistos nas fezes, podendo manter-se os títulos de anticorpos até 12 meses após a infecção do indivíduo. Ortega-Mora et al. (1992a), citados por Pereira da Fonseca (2000), verificaram, no caso dos ovinos, a existência de reações cruzadas entre *C. parvum* e *Eimeria* sp., já que havia partilha de epítomos pelos dois parasitas. Desta forma, os testes serológicos não são os mais adequados para o diagnóstico rotineiro de criptosporidiose, embora possam revelar-se úteis para estudos imunológicos e seroepidemiológicos (Pereira da Fonseca, 2000).

d) Detecção de DNA

A reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui uma alternativa para o diagnóstico de criptosporidiose para fins clínicos e ambientais. Embora a PCR seja um teste rápido e altamente específico e sensível, apresenta algumas limitações. Falsos positivos podem surgir como consequência de detecção de microrganismos não viáveis ou até de contaminação acidental no decorrer dos processos laboratoriais (Fayer et al., 2000).

A PCR permite fazer a diferenciação de espécies de *Cryptosporidium*, com base no gene 18S rRNA e, com os métodos de genotipagem baseados na PCR, retirar informações valiosas acerca do papel das diferentes populações do parasita nas interações estabelecidas com os hospedeiros, contribuindo para os estudos etiológicos e epidemiológicos da criptosporidiose (Pereira da Fonseca, 2000).

3.3.11. TRATAMENTO

A criptosporidiose é, frequentemente, auto-limitante em jovens com duração aproximada até duas semanas. O aparecimento da doença pode estar associado com os estados imunitário e nutricional dos indivíduos. Em casos mais graves, nos quais há necessidade de intervenção do médico veterinário, utiliza-se medicação de suporte com recurso a fluidoterapia oral ou endovenosa e reposição de eletrólitos, contrariando a desidratação consequente da diarreia aguda inerente à doença. A alimentação parenteral pode ser utilizada em algumas situações de forma a diminuir a agressão intestinal administrando simultaneamente fármacos anti-diarreicos para controlar a perda de fluidos (Pereira da Fonseca, 2000; Olson, 2002; Collinet-Adler & Ward, 2010).

Fármacos como a paromomicina, o lactato de halofuginona e o lasalocide têm demonstrado, segundo estudos laboratoriais, poder ser eficazes. Há, no entanto, alguns entraves à utilização destes fármacos. O lactato de halofuginona é categorizado como

quimioterápico e está descrito que em doses compreendidas entre 60 e 125 µg/kg por dia tem a capacidade de reduzir a gravidade e a prevalência de diarreia em vitelos e retardar a excreção de oocistos. Este fármaco pode, no entanto, revelar-se tóxico na dose de 500 µg/kg/dia. Um estudo conduzido na região de Aveiro (Portugal) por Madeira de Carvalho et al. (2011) evidenciou que o lactato de halofuginona (Halocur®) contribuiu para a redução do número de oocistos excretados e da intensidade da infeção, tendo igualmente contribuído para um decréscimo significativo na prevalência de diarreia em vitelos com 14 dias, quando administrado diariamente ao longo de 7 dias consecutivos (Olson, 2002; Olson et al., 2004; O'Handley & Olson, 2006; Madeira de Carvalho et al., 2011).

Em ensaios experimentais, demonstrou-se que o uso de paromomicina reduz a excreção de oocistos, bem como a frequência e duração da diarreia em vitelos e borregos (Olson, 2002; Olson et al., 2004; O'Handley & Olson, 2006).

Outros fármacos testados, que têm demonstrado atividade parcial no combate às infeções por *C. parvum* em ruminantes, incluem a nitazoxanida, o decoquinato e a sulfaquinoxalina (Wyatt et al., 2010).

Ainda assim, a criptosporidiose em vitelos deve ter um tratamento adjuvante através de fluidoterapia e correções do equilíbrio ácido-base e, se caso disso, do controlo de infeções bacterianas secundárias com recurso à antibioterapia (Olson, 2002).

3.3.12. PROFILAXIA E CONTROLO

Atualmente, não existem vacinas licenciadas para prevenir a infeção por organismos do género *Cryptosporidium*. Embora o uso de certos fármacos possa reduzir a excreção de oocistos, não a previne na totalidade. O colostro proveniente de fêmeas previamente expostas à infeção pode oferecer algum grau de proteção aos vitelos, sendo que a observação e o reconhecimento rápido dos sinais clínicos associados à doença é, atualmente, a melhor forma de minimizar a disseminação da doença no efetivo (Wyatt et al., 2010).

Uma correta administração do colostro aos vitelos, embora não impeça a ocorrência da diarreia e a excreção de oocistos, é importante na redução da gravidade da sintomatologia (Martins, 2018). Segundo Pereira da Fonseca (2000), um bom colostro define-se, quantitativamente, por conter quantidades suficientes de imunoglobulinas e, qualitativamente, por ter uma larga especificidade antimicrobiana. Os vitelos doentes devem ser separados do restante efetivo e tratados adequadamente de forma a minimizar a disseminação do agente. Outra medida de controlo passa por concentrar os partos do efetivo. Esta medida é vantajosa uma vez que permite a implementação de programas profiláticos com maior facilidade e, desta forma, evita-se a existência de vitelos novos em idades de risco ao longo de todo o ano

(Martins, 2018). Em extensivo deve, sempre que possível, proceder-se à rotação das cercas e desinfetar periodicamente os comedouros e bebedouros dos animais (Martins, 2018). Estudos laboratoriais demonstraram a ineficácia de muitos desinfetantes comerciais quando utilizados nas dosagens recomendadas pelos fabricantes (Pereira da Fonseca, 2000). A utilização dos mesmos em concentrações mais elevadas e com períodos de exposição mais prolongados revelou-se capaz de destruir os oocistos de *Cryptosporidium* spp., embora esta prática seja desaconselhada pelos efeitos adversos que pode causar a animais e humanos. A amónia a 50%, o peróxido de hidrogénio a 3% e a formalina a 10% são dos poucos que demonstraram eficácia após curtos períodos de exposição (Pereira da Fonseca, 2000). A água, que se apresenta como um meio de disseminação muito apetecível para os oocistos de *Cryptosporidium* spp., deve ser analisada e tratada, sabendo que levá-la até temperaturas de ebulição é suficiente para promover a destruição dos oocistos (Pereira da Fonseca, 2000).

As alterações da mucosa intestinal, que surgem como consequência da infeção por parasitas do género *Cryptosporidium*, estão, em vitelos lactentes, associadas à diminuição da capacidade de absorção de vitamina A. Assim, uma forma de contornar este ponto será a administração parenteral desta vitamina para que se evite a depleção das reservas do animal, que são limitadas à altura do nascimento. A exposição a vários agentes infecciosos nos primeiros dias de vida requer a mobilização daquela vitamina, que se apresenta crucial no papel de resistência às infeções, crescimento ósseo e aparelho reprodutor (Pereira da Fonseca, 2000).

Apesar de não existir vacinação contra a criptosporidiose pode, ainda assim, proceder-se à vacinação do efetivo contra outros agentes causadores de diarreias neonatais como, por exemplo, rotavírus, coronavírus e *E. coli*. Aumentando a imunidade do efetivo e reduzindo a probabilidade de ocorrência de infeções mistas por outros agentes patogénicos é possível reduzir a gravidade de futuras infeções por *Cryptosporidium parvum* (Martins, 2018).

3.3.13. DIFICULDADE DE ERRADICAÇÃO

São várias as premissas que tornam *Cryptosporidium parvum* um protozoário tão bem-sucedido e que dificultam a tarefa de erradicação da doença nos bovinos.

A capacidade do parasita se multiplicar nas células epiteliais intestinais do hospedeiro e voltar a infetá-las sem haver saída para o exterior, num processo denominado de autoinfeção, a resistência dos oocistos no meio ambiente, a presença de portadores assintomáticos nas explorações, o número elevado de oocistos excretados por animal e a difícil execução de protocolos terapêuticos em animais de explorações em regime extensivo,

são fatores que contribuem para a perpetuação do parasita no ecossistema das explorações (Martins, 2018).

Segundo Ryan et al. (2016), os biofilmes presentes na água de bebida dos animais podem potencializar o risco de infecção ao servirem de reservatórios de oocistos do parasita. Segundo os autores, as propriedades destes agregados de microrganismos permitem concentrar progressivamente oocistos de *Cryptosporidium* spp., protegendo-os da ação da radiação ultravioleta (Ryan et al., 2016).

3.3.14. IMPACTO ECONÓMICO

O impacto económico na produção pecuária associado à ocorrência de criptosporidiose em vitelos está fortemente associado à diarreia. A diarreia, principal evidência da doença, causa desidratação, atraso no crescimento e, menos frequentemente, mortalidade dos animais doentes. Esta situação requer que os produtores tenham despesas diretas inerentes ao tratamento dos animais com a doença e que sofram cortes orçamentais indiretos relacionados com a diminuição do ganho médio diário dos animais doentes e com a mortalidade. Diretamente, no tratamento da diarreia neonatal bovina, os produtores vêm-se forçados a gastar recursos financeiros em alguns cuidados essenciais como, por exemplo, na administração de soluções eletrolíticas e fármacos. As perdas económicas são mais significativas quando *Cryptosporidium* spp. é acompanhado por outros agentes concomitantes (De Graaf et al., 1999).

Porém, segundo O'Handley & Olson (2006), não há evidências que indiquem que a criptosporidiose intestinal resulte em impacto económico a longo prazo na produção pecuária de espécies ruminantes. De facto, em estudos em que vários fármacos foram utilizados, não foram encontradas diferenças significativas entre animais tratados e não tratados no que respeita ao ganho de peso. Segundo os autores, o impacto económico associado às infeções por *C. parvum* está estritamente relacionado com as perdas devido à mortalidade e custos inerentes ao tratamento de animais com a doença. Já a criptosporidiose do abomaso tem potencial para limitar fortemente a produção. De facto, *C. andersoni* está associado ao surgimento de animais com peso vivo abaixo do esperado. O impacto económico associado à criptosporidiose bovina é sempre maior quando se está perante surtos da doença que implicam tratamento de um grande número de animais e, consequentemente, despesas substanciais e prolongadas (O'Handley & Olson, 2006; Madeira de Carvalho et al., 2011).

CAPÍTULO 4 – CONTRIBUIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE INFEÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM VITELOS DE EXPLORAÇÕES DE CARNE DAS SUB-REGIÕES DO ALENTEJO CENTRAL E LITORAL

4.1. OBJETIVOS

As regiões do Alentejo Central e Litoral, áreas de atuação da VETAGROMOR Lda., são prolíferas na produção de ruminantes em extensivo, nomeadamente ovinos e bovinos.

A escolha deste tema surgiu em conversa com os meus orientadores que me alertaram para o facto de este ser um problema grave e silencioso na maioria das explorações de carne. A verdade é que, embora nem sempre diagnosticada, a criptosporidiose é quase sempre uma causa constante por detrás das diarreias neonatais bovinas.

A maioria dos produtores não está ainda sensibilizada para este problema que, devidamente controlado, poderia refletir-se num aumento do rendimento da exploração.

Os principais objetivos deste estudo foram:

- Determinar a percentagem de infeção por *Cryptosporidium* spp. nas explorações de bovinos de carne em estudo e na área geográfica em que se encontram;
- Estabelecer uma comparação com resultados obtidos em estudos prévios de outros autores;
- Detecção de possíveis más práticas de manejo, delineando estratégias preventivas para tentar controlar e conter a ocorrência e perpetuação da doença nas explorações;
- Traçar uma relação de custo-benefício na adoção de medidas preventivas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. ÁREA GEOGRÁFICA ABRANGIDA PELO ESTUDO

As explorações que foram alvo de recolha de amostras fecais estão sediadas nos distritos de Évora e Setúbal, que fazem parte das sub-regiões do Alentejo Central e Litoral, respetivamente. Os dois distritos, juntos, perfazem uma área aproximada de 12457 km².

Mais especificamente, os concelhos com explorações presentes neste estudo são Montemor-o-Novo, Arraiolos, Redondo, Vendas Novas, Reguengos de Monsaraz e Alcácer do Sal, sendo este último o único representante da sub-região do Alentejo Litoral. Os seis concelhos juntos perfazem uma área aproximada de 4472,49 km² de superfície, sendo que a grande maioria pertence ao Alentejo Central (2972,62 km²) e o restante ao Alentejo Litoral (1499,87 km²) (Wikipédia, 2019).

Abaixo, na figura 10, estão delimitados os concelhos que contêm as explorações que foram alvo de estudo no presente trabalho.

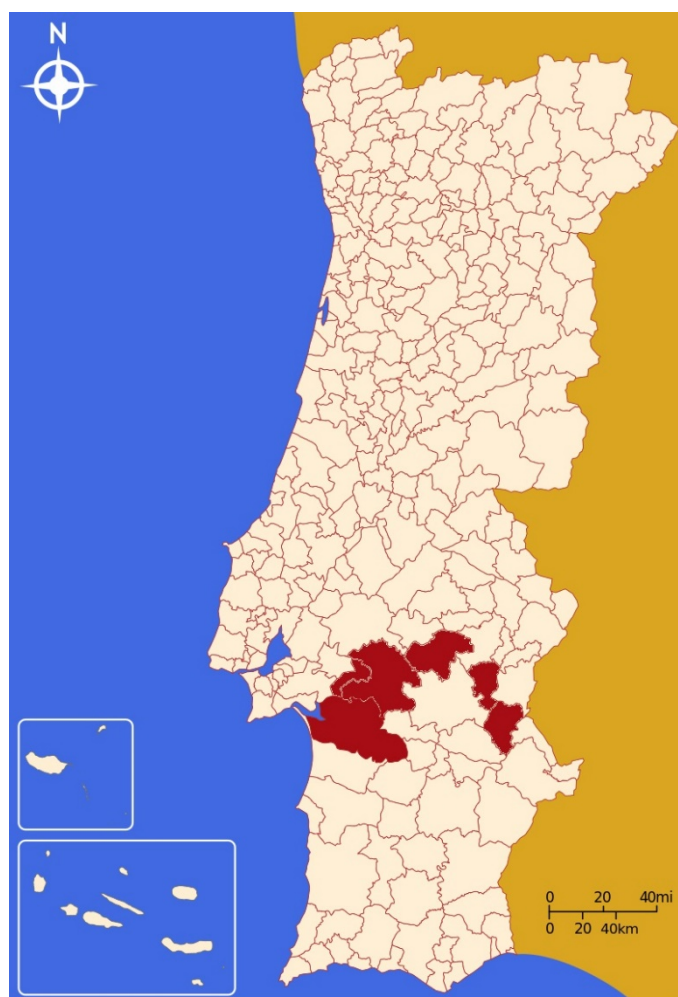


Figura 10. Concelhos alvo de estudo (a vermelho) (adaptado de Wikipédia, 2019)

Segundo o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2019), o clima de Portugal Continental divide-se, segundo Köppen, em duas regiões: uma de clima temperado com inverno chuvoso e verão seco e quente (Csa) e outra de clima temperado com inverno chuvoso e verão seco e pouco quente (Csb). Ora, os seis concelhos presentes neste trabalho são classificados, em termos climáticos, como Csa, ou seja, são regiões de clima temperado com verões quentes e secos e invernos chuvosos. As duas grandes diferenças que podem ser destacadas entre os cinco concelhos do distrito de Évora e o concelho do distrito de Setúbal são a composição dos solos e a flora envolvente. Os solos das explorações do concelho de Alcácer do Sal constituem-se muito arenosos face ao que se verifica nas do distrito de Évora. Em termos de flora envolvente verifica-se uma maior riqueza na sub-região do Alentejo Litoral, já que o Alentejo Central é marcado por vastas planícies com uma presença substancialmente inferior no que respeita a espécies arbóreas.

Em relação ao efetivo bovino, segundo dados do Instituto Nacional de Estatística (2019) relativos ao segundo semestre de 2018, crê-se que, a 01 de dezembro do referido ano, o número de cabeças fosse aproximadamente de 1.632.000 em Portugal, das quais 677.000 pertenciam à região do Alentejo.

4.2.2. EXPLORAÇÃO EM REGIME EXTENSIVO

As 22 explorações alvo de colheita de amostras para a realização deste estudo dedicam-se à produção de carne bovina em regime extensivo. Assim, são explorações que mantêm os animais a campo, aproveitando os recursos naturais das suas pastagens, fazendo suplementação alimentar em períodos de carência e/ou quando necessário para atingir determinados objetivos.

Priorizam-se animais resistentes, com um ciclo reprodutivo regular e que exibam facilidade de parto e boa capacidade leiteira para criarem vitelos de qualidade ao desmame.

4.2.3. AMOSTRAGEM

A amostragem deste trabalho foi obtida por conveniência, de acordo com os serviços agendados pela VETAGROMOR Lda. e serviços de caráter urgente que foram surgindo ao longo do período de recolha.

A amostragem utilizada englobou um total de 105 vitelos de ambos os sexos, provenientes de 22 explorações (numeradas de 1 a 22 para efeitos de proteção da privacidade), sediadas na área geográfica supracitada (Figura 10), e com idades compreendidas entre os 10 e os 30 dias de vida.

4.2.4. INQUÉRITO

Foi elaborado um inquérito sucinto (Anexo 1) como forma auxiliar de obtenção de dados relevantes sobre as explorações alvo de estudo e as suas práticas de manejo. Estes dados foram preenchidos com auxílio do Dr. Feliciano Reis, médico veterinário responsável por todas elas, que é conhecedor de cada uma das explorações por força dos anos de trabalho nesses locais.

4.2.5. COLHEITA DAS AMOSTRAS

A colheita das amostras foi efetuada entre os meses de janeiro de 2019 e maio de 2019, tendo sido aproveitada a elevada concentração de partos ao longo desse período.

As amostras foram obtidas por estimulação retal e acondicionadas diretamente num copo de plástico individual e próprio para este efeito, onde era imediatamente colocada uma etiqueta identificadora do animal, data de colheita e exploração em causa. Foram igualmente registadas as consistências das fezes (semipastosas, pastosas ou diarreicas) de todos os animais estudados para posterior correlação com os resultados obtidos.

O volume das amostras variou consoante o animal e a própria consistência das fezes, tendo oscilado entre os 10 mL e os 80 mL.

Após a colheita, as amostras eram refrigeradas a $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ nas instalações da VETAGROMOR Lda. e, o mais cedo possível, transportadas para o Laboratório Veterinário da Coprapec de Montemor-o-Novo, onde ficavam igualmente refrigeradas até ao seu processamento. Este processamento e consequente análise foram efetuados nas instalações laboratoriais da Coprapec de Montemor-o-Novo sob supervisão das médicas veterinárias Dr.^a Isabel Mariano, Dr.^a Sílvia Lopes e da analista Carla Sampaio.

4.2.6. DETEÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp.

Nesta parte do estudo foi utilizada a técnica de esfregaço fecal corado pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (adaptado de Pereira da Fonseca, 2000).

a) Obtenção dos esfregaços fecais

(adaptado e modificado de Pereira da Fonseca, 2000)

Para a realização dos esfregaços fecais deve adicionar-se uma pequena quantidade de fezes e proceder-se à homogeneização e distribuição por escorregamento das mesmas com recurso a uma zaragatoa.

Finalizado o processo deixa-se a secar à temperatura ambiente durante várias horas sendo que, no nosso caso, este período foi de aproximadamente 24 horas.

b) Coloração de Ziehl-Neelsen modificada

(adaptado e modificado de Pereira da Fonseca, 2000)

- Fixar as lâminas com álcool metílico durante 1 minuto;
- Corar com fucsina filtrada durante 10 minutos;
- Lavar com água corrente;
- Eliminar o corante em excesso com álcool clorídrico a 1%;
- Lavar com água corrente;
- Corar com verde malaquite a 0,4% durante 30 segundos;
- Lavar com água corrente;
- Deixar secar ao ar.

As figuras 11 e 12 ilustram algumas partes do processo acima mencionado.

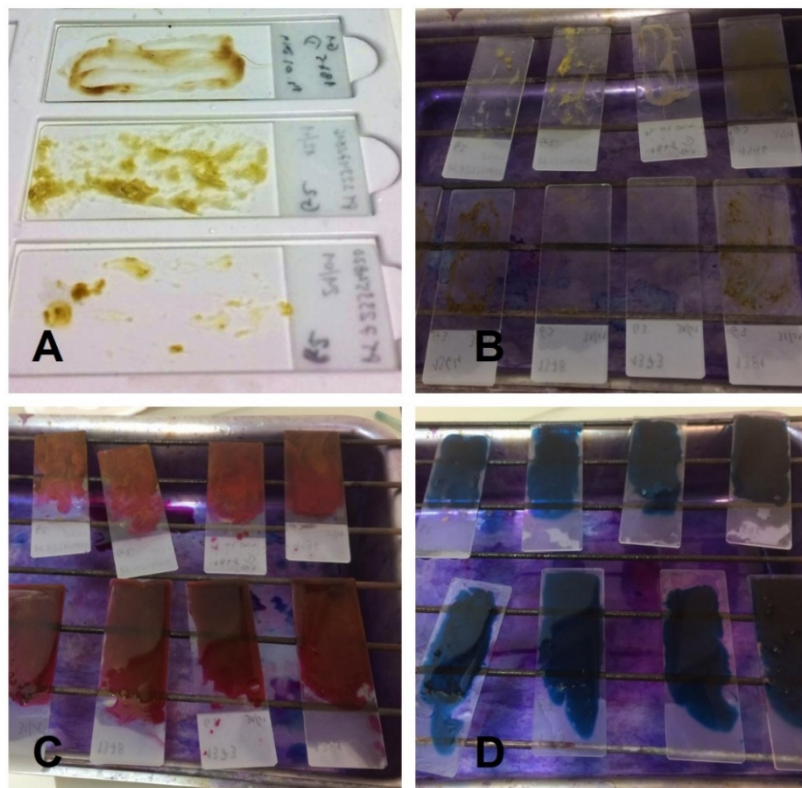


Figura 11. Esfregaços fecais (A) e técnica de Ziehl-Neelsen modificada: fixação com álcool metílico (B), colorações com fucsina (C) e verde malaquite (D) (original)

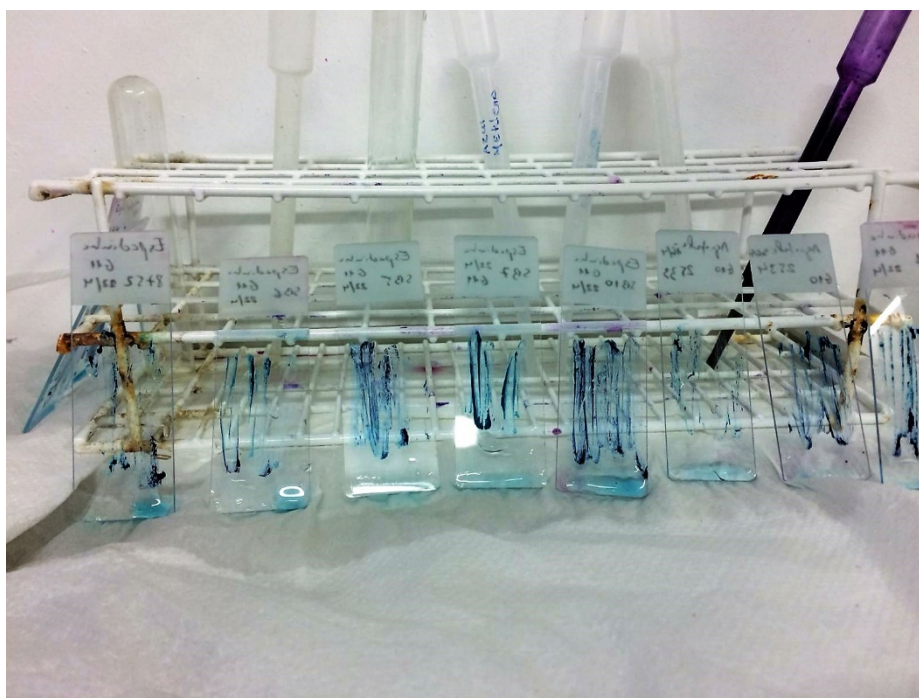


Figura 12. Lâminas após coloração por Ziehl-Neelsen modificada (original)

c) Observação ao microscópio

As lâminas foram observadas com recurso a um microscópio ótico utilizando a ocular de 10x e as objetivas de 40x e 100x (imersão).

As amostras dadas como positivas pertenciam a lâminas que continham pelo menos um oocisto do género *Cryptosporidium*, sendo que toda a superfície da lâmina abrangida pelo esfregaço fecal foi atentamente examinada.

Os oocistos são facilmente identificáveis através da sua aparência rosada e forma esférica ou semiesférica (figura 13).

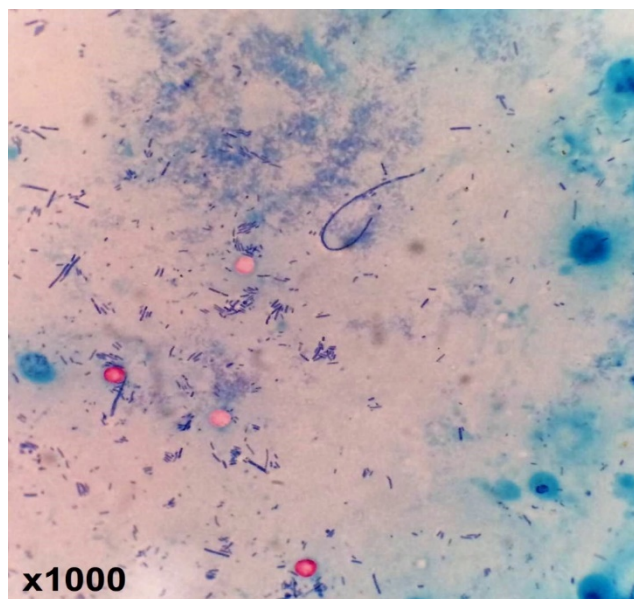


Figura 13. Observação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. numa ampliação de 1000x (original)

4.3. RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados das observações dos esfregaços fecais após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada.

Iremos focar-nos na exposição das percentagens de infeção por *Cryptosporidium* spp. por conelho, por exploração, dentro de cada uma das explorações alvo de estudo e dos animais com fezes diarreicas, pastosas e semipastosas.

4.3.1. DADOS PARASITOLÓGICOS

a) Percentagem global de infeção

Das 105 lâminas analisadas, uma por animal, 27 encontraram-se com pelo menos um oocisto de *Cryptosporidium* spp., correspondendo a uma percentagem global de infeção de 25,7%.

b) Explorações com animais positivos

Das 22 explorações onde se realizou colheita de amostras, em 14 surgiu pelo menos um animal positivo aquando da observação ao microscópio do esfregaço fecal corado pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Este resultado corresponde, portanto, a um valor percentual de 63,6% de explorações positivas ao teste.

c) Percentagem de infeção nas sub-regiões

As duas sub-regiões estudadas compreendem o Alentejo Central e Litoral.

Os dados abaixo apresentados encontram-se expostos no gráfico 4.

o Alentejo Central

Nesta sub-região foram testados 87 vitelos pertencentes a 5 concelhos diferentes, dos quais 24 continham pelo menos um oocisto de *Cryptosporidium* spp. à observação microscópica dos esfregaços fecais. A percentagem de infeção dentro desta sub-região foi, por isso, de 27,6% (24/87).

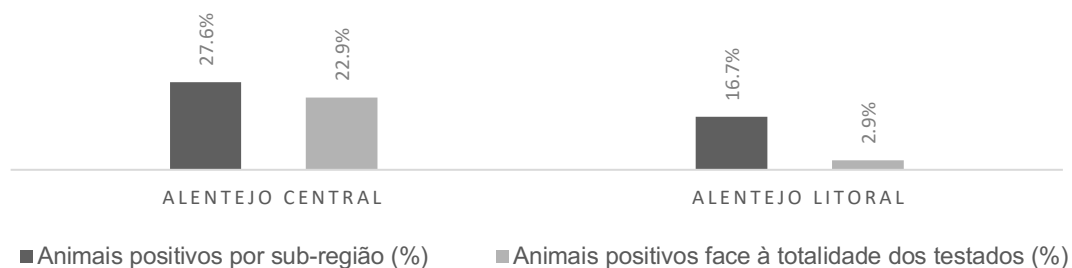
A percentagem dos animais positivos face à totalidade dos testados foi de 22,9% (24/105).

o Alentejo Litoral

Nesta sub-região foram testados 18 vitelos pertencentes a 1 só concelho, dos quais apenas 3 foram considerados positivos à observação microscópica dos esfregaços fecais. A percentagem de infeção dentro desta sub-região foi, por isso, de 16,7% (3/18).

A percentagem dos animais positivos face à totalidade dos testados foi de 2,9% (3/105).

Gráfico 4. Percentagem de infeção dentro das sub-regiões alvo de estudo e o respetivo peso na totalidade de animais testados (N=105) (original)



d) Concelhos positivos

Neste parâmetro apenas o concelho de Vendas Novas não contribuiu com animais positivos. Todos os restantes (Montemor-o-Novo, Arraiolos, Redondo, Alcácer do Sal e Reguengos de Monsaraz) apresentaram pelo menos um animal positivo ao teste. Assim, a percentagem de infeção por *Cryptosporidium* spp. nos seis concelhos foi de 83,3%.

e) Explorações positivas por concelho

Aqui considerou-se uma exploração positiva quando nela existiu pelo menos um caso positivo de *Cryptosporidium* spp.

o Montemor-o-Novo

No concelho de Montemor-o-Novo, num total de 10 explorações testadas, 7 apresentaram animais positivos ao parasita (70,0%).

o Arraiolos

Neste concelho foram testadas 5 explorações diferentes, sendo que 3 delas apresentaram animais positivos ao teste (60,0%).

o Redondo

O concelho do Redondo foi testado em 2 explorações, tendo numa delas sido detetados vitelos positivos após observação microscópica dos esfregaços fecais (50,0%).

o Alcácer do Sal

Em Alcácer do Sal foram visitadas 3 explorações e em 2 delas foram observados animais positivos ao teste (66,7%).

o Vendas Novas

Como referido anteriormente este foi o único concelho sem animais positivos à observação microscópica dos esfregaços (0%).

o Reguengos de Monsaraz

A única exploração visitada neste concelho foi considerada positiva (100%).

Gráfico 5. Explorações positivas por concelho (original)



f) Animais positivos por concelho

o Montemor-o-Novo

Num total de 64 vitelos examinados, em 10 explorações diferentes, o concelho de Montemor-o-Novo contou com 19 animais positivos a *Cryptosporidium* spp., correspondendo a um valor percentual de 29,7% de positivos neste concelho.

o Arraiolos

Foram testados 6 animais de 5 explorações para *Cryptosporidium* spp. e 3 deles revelaram o parasita (50,0%).

o Redondo

Num total de 9 animais, provenientes de duas explorações distintas, apenas 1 deles se apresentou positivo a *Cryptosporidium* spp., correspondendo a 11,1% dos animais dentro do concelho.

o Alcácer do Sal

Em três explorações distintas, num total de 18 animais testados, 3 deles revelaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes (16,7%).

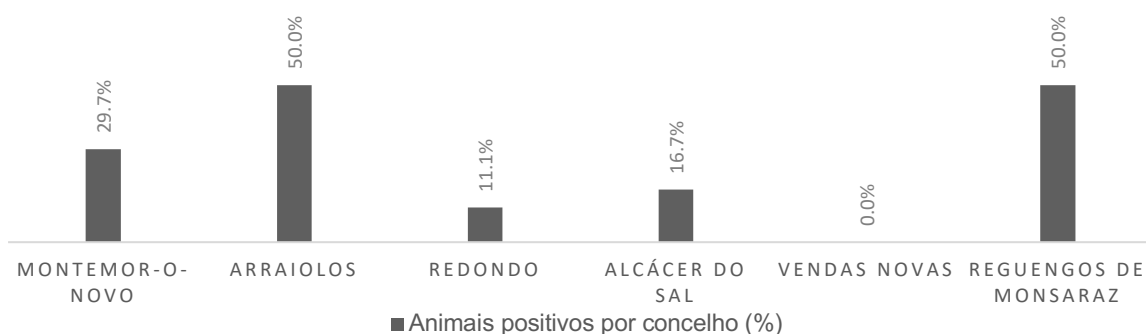
- **Vendas Novas**

Os 6 animais, provenientes da mesma exploração, foram considerados negativos após observação microscópica dos esfregaços fecais.

- **Reguengos de Monsaraz**

Neste concelho apenas dois animais foram testados, provenientes da mesma exploração, e um manifestou-se como positivo e outro como negativo (50,0%).

Gráfico 6. Animais positivos por concelho (original)



g) Percentagem de infeção nos concelhos *versus* percentagem de infeção face ao total de animais examinados

Neste ponto pensamos que seja de interesse comparar sucintamente a importância e o peso dos casos positivos quando meramente dentro de um concelho e quando inseridos num panorama mais global do estudo. Neste último ponto considerar-se-á os casos positivos em cada concelho tendo por base o total de animais examinados (N=105).

- **Montemor-o-Novo**

A percentagem de animais positivos dentro deste concelho ficou estabelecida, conforme supracitado, nos 29,7% (19/64). No contexto geral, os animais positivos do concelho de Montemor-o-Novo perfazem um valor de 18,1% de positivos (19/105).

- **Arraiolos**

Neste concelho foram testados 6 animais e 3 deles apresentaram-se positivos ao teste de deteção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., tendo, por isso, uma percentagem de infeção de 50,0% dentro do concelho (3/6). Em termos globais este valor é de 2,9% (3/105).

- **Redondo**

Foram testados 9 animais, dos quais apenas 1 se apresentou positivo. A percentagem de infeção dentro do concelho é de 11,1% (1/9). Em termos mais gerais este valor é de, aproximadamente, 1% (1/105).

- **Alcácer do Sal**

No concelho de Alcácer do Sal procedeu-se à colheita de 18 amostras pertencentes, cada uma delas, a um animal diferente. Desses 18 animais apenas 3 estavam positivos, representando uma percentagem de infeção de 16,7% dentro do referido concelho (3/18). Em termos globais, esta percentagem foi de 2,9% (3/105).

- **Vendas Novas**

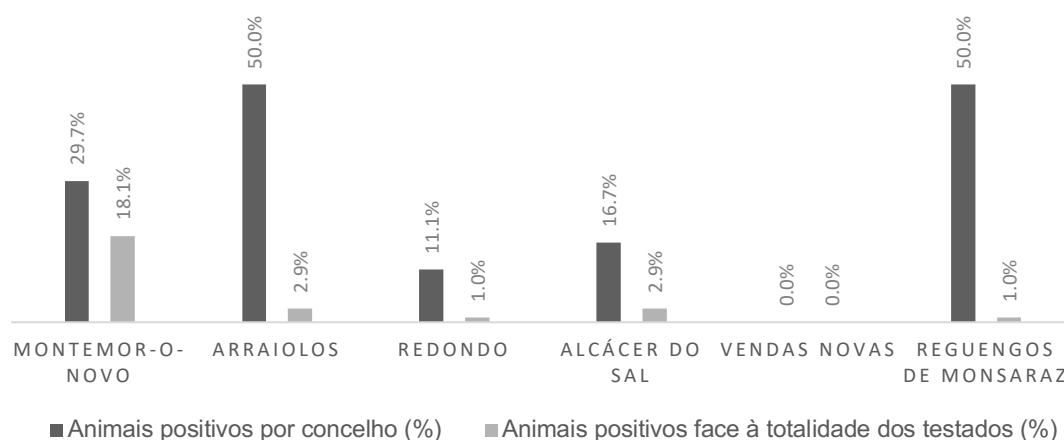
A percentagem de infeção no concelho foi nula (0/6) e, consequentemente, em termos globais também (0/105).

- **Reguengos de Monsaraz**

Foram testados 2 animais, dos quais apenas 1 foi dado como positivo (50,0%). Na globalidade o valor percentual manifesta-se, aproximadamente, por 1% (1/105).

O gráfico 7 representa as percentagens de infeção por *Cryptosporidium* spp. dentro de cada um dos seis concelhos e, igualmente, os respetivos valores percentuais face à amostragem global do estudo (N=105).

Gráfico 7. Percentagem de infeção nos concelhos versus percentagem de infeção face à globalidade de animais testados (original)



h) Animais positivos por exploração

○ Montemor-o-Novo

Neste concelho foram analisadas 10 explorações, variando o número de animais testados entre 1 e 18, com percentagens de animais positivos que variou entre 0 e 100%.

○ Arraiolos

Neste concelho foram analisadas 5 explorações, variando o número de animais testados entre 1 e 2, com percentagens de animais positivos que variou entre 0 e 100%.

○ Redondo

Neste concelho foram analisadas 2 explorações, sendo que numa delas foi testado apenas 1 animal enquanto que na outra foram testados 8. A percentagem de animais positivos foi de 100% na primeira e 0% na segunda.

○ Alcácer do Sal

Neste concelho foram analisadas 3 explorações, variando o número de animais testados entre 1 e 13, com percentagens de animais positivos que variou entre 0 e 100%.

○ **Vendas Novas**

Neste concelho foi analisada apenas uma exploração, com um total de 6 animais testados e uma percentagem de animais positivos de 0%.

○ **Reguengos de Monsaraz**

Neste concelho foi analisada apenas uma exploração, com um total de 2 animais testados e uma percentagem de animais positivos de 50%.

Os dados acima mencionados encontram-se discriminados na tabela 3.

Tabela 3. Animais positivos por exploração.

Concelho	Exploração	Animais testados	Animais positivos
Montemor-o-Novo	1	4	1
	2	1	1
	3	1	0
	4	5	1
	5	1	1
	6	15	7
	7	2	0
	8	11	0
	9	18	6
	10	6	2
Arraiolos	11	1	0
	12	1	1
	13	1	1
	14	1	1
	15	2	0
Redondo	16	1	1
	17	8	0
Alcácer do Sal	18	13	0
	19	4	2
	20	1	1
Vendas Novas	21	6	0
Reguengos de Monsaraz	22	2	1
TOTAL	---	105	27

i) Consistência das fezes e positividade das amostras

Neste ponto pretende-se estabelecer uma associação entre os resultados obtidos e a consistência das fezes dos animais testados.

A consistência foi estabelecida através da avaliação macroscópica das fezes colhidas nos animais, posteriormente, agrupadas em três conjuntos: fezes diarreicas, pastosas e semipastosas.

Após esta avaliação concluiu-se que 31,4% das amostras se inseriam no grupo das fezes diarreicas (33/105), 58,1% no grupo das fezes pastosas (61/105) e 10,5% no grupo das fezes semipastosas (11/105).

Dentro das 33 amostras consideradas como diarreicas, 16 apresentaram-se positivas à observação microscópica de oocistos de *Cryptosporidium* spp., apresentando uma percentagem de positivos de 48,5% dentro deste grupo (16/33).

Dentro das 61 amostras consideradas como pastosas, apenas 11 se apresentaram positivas à mesma observação, representando, por isso, uma positividade de 18,0% dentro deste grupo (11/61).

As 11 amostras consideradas como semipastosas apresentaram-se todas negativas à observação microscópica.

Estes dados estão disponíveis abaixo nos gráficos 8 e 9.

Gráfico 8. Distribuição das amostras por consistências fecais face à amostragem total (original)

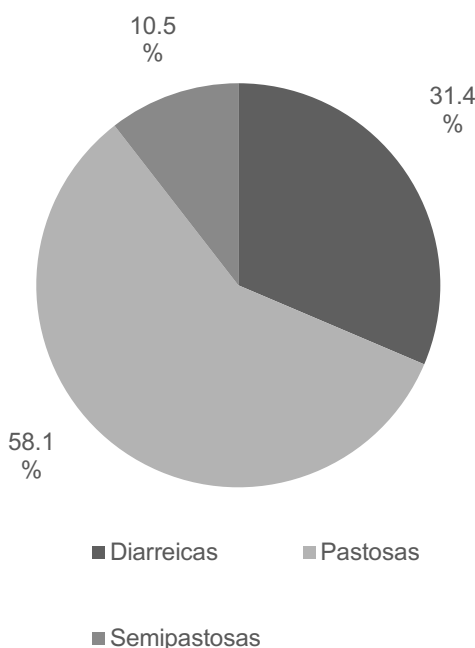
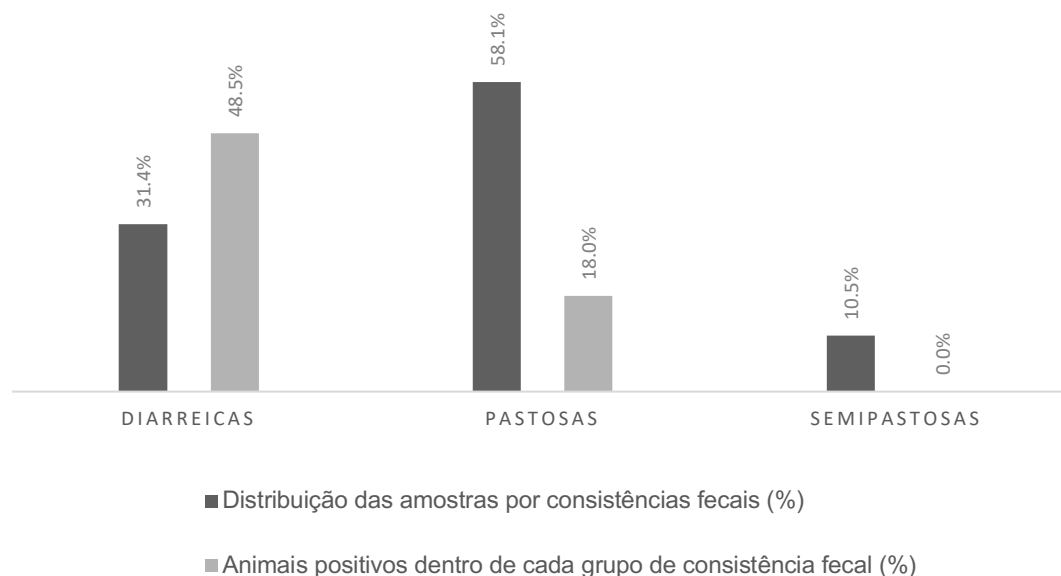


Gráfico 9. Distribuição das amostras por consistências fecais face à amostragem total e percentagem de animais positivos dentro dos três grupos (original)



j) Reidratação endovenosa e positividade das amostras

Em situações de diarreias neonatais graves, os produtores recorrem ao médico veterinário na tentativa de reverter uma situação de desidratação grave originada por uma diarreia profusa que atinge os vitelos no decorrer do primeiro mês de vida.

Dos 105 animais testados para *Cryptosporidium* spp., apenas 12 foram, previamente à análise, alvo desta reidratação endovenosa com cloreto de sódio a 0,9%, soro glucosado a 5% e bicarbonato de sódio 8,4%. Estes 12 animais representam 11,4% no universo dos 105.

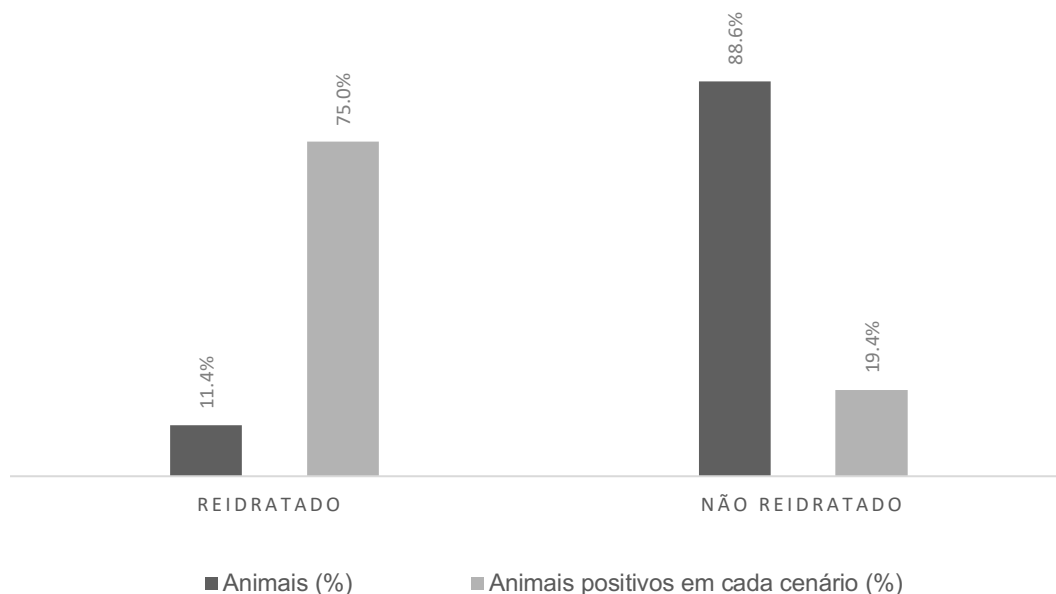
Dos 12 animais reidratados, 9 foram considerados positivos à observação microscópica (75,0%).

Dos 93 animais que não foram reidratados, 18 foram considerados positivos à mesma observação (19,4%).

As informações supracitadas estão representadas no gráfico 10.

Em termos globais podemos verificar que apenas 33% dos animais positivos (9/27) foram reidratados e que 67% dos positivos (18/27) não o foram.

Gráfico 10. Comparação entre os animais alvo de reidratação endovenosa e aqueles em que não houve atuação do médico veterinário a este nível e respectivas percentagens de infecção (original)



k) Vacinação das fêmeas gestantes contra *E. coli*, rotavírus e coronavírus e positividade das amostras

Em vinte e duas explorações analisadas, onze procede à vacinação das fêmeas no último terço da gestação contra *E. coli*, rotavírus e coronavírus. Dessas 11 explorações, 7 apresentaram animais positivos a *Cryptosporidium* spp.

Das 11 explorações onde as fêmeas gestantes não são vacinadas contra estes três agentes etiológicos da diarreia neonatal bovina, 7 apresentaram animais positivos ao *Cryptosporidium* spp.

Teoricamente, não houve diferenças nos resultados apresentados em cada um dos cenários. Acontece que, na prática, foram acentuadas as diferenças observadas entre as explorações onde este protocolo vacinal é realizado e aquelas em que o mesmo não se realiza. Este tópico será discutido, mais à frente, no capítulo da discussão.

4.3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES COM BASE NO INQUÉRITO

Com base no inquérito às explorações conseguimos perceber que, no que respeita aos casos de diarreia ocorridos ao longo do período de colheita de amostras, a percentagem de casos situou-se nos 0-10% em 21 explorações, tendo sido de 10-25% em apenas uma delas. Não podemos, por isso, estabelecer uma relação direta entre o número de casos ocorridos e a percentagem de infeção por *Cryptosporidium* spp. nas explorações, já que o que está em causa não passa pela quantidade observada.

Em 18 das 22 explorações estudadas os vitelos com sintomatologia diarreica grave são submetidos a fluidoterapia endovenosa, sendo que os principais motivos de chamada do médico veterinário prendem-se com situações de vitelo caído, que não mama e/ou que apresenta fezes diarreicas. Nestes casos é adotado um protocolo terapêutico tendo por base a administração de antibióticos, anti-inflamatórios e a realização da já mencionada fluidoterapia endovenosa.

Em 90% das explorações, após a reidratação do animal, este é mantido a campo. A manutenção dos vitelos em abrigos após o tratamento é uma medida adotada sobretudo no inverno e, mesmo assim, quase nunca se verifica.

Em relação à profilaxia da vacada, é feita a vacinação para as clostridioses (Multivac 9®) em todas as explorações alvo de estudo. Por seu turno, a vacinação para agentes como *Escherichia coli*, rotavírus e coronavírus (Rotavec Corona®) nem sempre é feita. Apenas 11 explorações adotam esta medida preventiva.

Relativamente à origem da água de bebida dos animais, nenhuma das 22 explorações utiliza a rede de abastecimento pública para esse efeito. Assim, todas elas fornecem água aos seus animais oriundas de barragens, charcas, poços, furos e/ou ribeiras. Em nenhuma delas é feita qualquer tipo de testagem e/ou tratamento às mesmas.

4.4. DISCUSSÃO

O grande objetivo deste estudo passava por aferir a percentagem de infeção por *Cryptosporidium* spp. em vitelos com idades compreendidas entre os 10 e os 30 dias de vida. Estes animais, conforme mencionado, pertenciam a 22 explorações dedicadas à produção de carne bovina espalhadas pelas sub-regiões do Alentejo Central e Litoral.

Após análise dos resultados observámos uma percentagem global de infeção de 25,7% (27/105) e 63,6% das explorações (14/22) continham pelo menos um vitelo infetado por *Cryptosporidium* spp.

Outros estudos realizados em Portugal apresentaram os seguintes resultados: 25,4% na Beira Litoral e Entre Douro e Minho (Mendonça et al., 2007); 74,8% na região de Aveiro em animais até aos 3 meses de idade e provenientes de explorações leiteiras (Martins et al., 2007); 44% em Montemor-o-Novo em animais provenientes de duas explorações leiteiras (Pereira da Fonseca, Mariano & Lopes, 1997); 23,3% nas regiões do Alentejo e do Ribatejo e Oeste (Pereira da Fonseca, 2000); 31,2% na Ilha Terceira, Açores (Barros, 2015).

Olhando para a prevalência de 21,1% encontrada há praticamente 20 anos por Pereira da Fonseca (2000) na região do Alentejo verifica-se que as melhorias não foram muitas, já que nas sub-regiões abrangidas por este estudo e pertencentes ao Alentejo a percentagem de infeção registada foi de 25,7%. Uns anos antes, Pereira da Fonseca et al. (1997) observaram uma taxa de infeção de 44% em Montemor-o-Novo, contrastando com os 29,7% observados neste concelho no presente estudo. Esta divergência de resultados pode explicar-se devido às diferenças de idades dos animais estudados e às suas aptidões. Em 1997, o estudo abrangeu animais oriundos de duas explorações leiteiras e com idades compreendidas entre 1 e 120 dias de vida (Pereira da Fonseca et al., 1997). Já no presente estudo, os animais estudados tinham idades compreendidas entre os 10 e os 30 dias de vida e eram provenientes de explorações de carne. Segundo alguns autores, o tipo de exploração influencia a percentagem de infeção por *Cryptosporidium* spp. (Pereira da Fonseca, 2000; Duranti et al., 2009) podendo, por isso, explicar-se esta diferença de resultados no concelho de Montemor-o-Novo.

Desta forma, todas estas comparações devem ser feitas cautelosamente atendendo à idade dos grupos estudados, amostragem total, região estudada e método de identificação utilizado.

Atentando às duas sub-regiões envolvidas no estudo verificou-se que a percentagem de infeção por *Cryptosporidium* spp. na sub-região do Alentejo Central foi mais elevada quando comparada com aquela verificada no Alentejo Litoral. Na primeira obteve-se um resultado de 27,6% (24/87), enquanto na segunda este valor foi de 16,7% (3/18). Claro que é preciso ter em consideração que estes resultados são apenas estimativos, uma vez que o número de animais estudados não é muito elevado, principalmente na sub-região do Alentejo Litoral em que as 18 amostras foram colhidas num só concelho e, por isso, não representam estatisticamente a totalidade da população existente nas sub-regiões. Importa igualmente referir que estes valores acima apresentados podem ser inferiores ao que existe na realidade, já que, segundo Fayer et al. (1998), o resultado apresentado mediante uma observação de uma única amostra por animal recolhida num certo momento pode não revelar a infeção por esta ainda se encontrar numa fase inicial e/ou até numa fase interrompida da excreção de oocistos dando origem, desta forma, a falsos negativos.

No presente trabalho utilizou-se um método que consistia na realização de esfregaço fecal direto com coloração de Ziehl-Neelsen modificada. Esta técnica pode não ser tão sensível quando comparada com outras apresentando, por isso, alguma desvantagem no que respeita à detecção de casos positivos, por exemplo, em infecções pouco graves ou subclínicas. Por outro lado, é importante não esquecer que a excreção de oocistos pelos animais é feita de forma intermitente e, no caso da técnica de Ziehl-Neelsen modificada, a sua sensibilidade pode não ser suficiente para detetar infecções em períodos de pouca excreção de oocistos. Ainda assim, não podemos deixar de reconhecer as vantagens desta técnica, que passam pela rapidez do processo, fácil visualização dos oocistos e preço reduzido na execução da mesma (Pereira da Fonseca, 2000). Desta forma, e na nossa perspetiva, a sua utilização em paralelo com outros métodos de diagnóstico como os testes rápidos continua a ser uma ferramenta importante na tomada de decisão quanto à terapêutica etiológica e adjuvante a implementar nos casos graves de criptosporidiose.

Posto isto, seria importante fazer o exercício de comparar diferentes abordagens no que diz respeito ao manejo das vacadas nas regiões abrangidas pelo estudo. É importante referir que todas as explorações estudadas têm os seus animais vacinados contra as clostridioses, mas nem todas o fazem contra agentes como *E. coli*, rotavírus e coronavírus.

E este último ponto é particularmente importante, pois das 22 explorações alvo de estudo, 11 delas tinham as vacadas vacinadas para estes três agentes e 11 delas não. Das 11 que têm essa vacinação em dia (vacinação no último terço da gestação com Rotavec Corona®) 7 delas apresentaram animais com pelo menos um oocisto. Das 11 que não fazem esse protocolo vacinal 7 apresentaram pelo menos um animal positivo. Ou seja, teoricamente não haveria grandes diferenças entre umas e outras. Mas, na prática, a diferença é grande e passa pela presença de sinais clínicos de criptosporidiose. É que, nas explorações vacinadas contra aqueles três agentes patogénicos, a manifestação clínica da criptosporidiose (que, como se sabe, é oportunista) foi mínima e subtil. Nestes casos, os animais apresentavam-se bem, não muito debilitados e qualquer sintomatologia leve era solucionada facilmente com recurso à fluidoterapia. Aconteceu também, em vários animais destas explorações, não observar qualquer tipo de alteração naqueles que estavam parasitados. Ou seja, encontrámos, muitas vezes, animais com fezes de consistência não diarreica, sem sinais de desidratação ou prostração que, na análise dos esfregaços fecais ao microscópio, se revelaram positivos, sendo, portanto, importante não esquecer o papel destes portadores assintomáticos na manutenção da doença nas explorações. Já nas explorações não vacinadas com Rotavec Corona®, os vitelos, que posteriormente viriam a ser dados como positivos, já exibiam sintomatologia diarreica e sinais de prostração e desidratação no momento da colheita das fezes.

Em seguimento do ponto anterior e olhando para a consistência das fezes, que como já referido, se apresentaram grande parte das vezes diarreicas em explorações onde não havia profilaxia da vacada com Rotavec Corona®, observámos que praticamente metade das amostras com fezes diarreicas se apresentaram positivas à altura da observação microscópica de oocistos (48,5%), enquanto que nas restantes consistências as percentagens de infeção por *Cryptosporidium* spp. foram substancialmente mais baixas. Estes resultados vão ao encontro do que já foi mencionado anteriormente. *Cryptosporidium* spp. é um agente oportunista que, muitas vezes, está presente nos solos e nas águas e que tem a capacidade de resistir durante longos períodos de tempo (Barwick, Mohammed, White, & Bryant, 2003). Quando os animais são provenientes de vacadas não vacinadas contra os três agentes acima mencionados, isso poderá servir como porta de entrada para infeção por *Cryptosporidium* spp. e, conseqüentemente, o aparecimento de sintomatologia clássica desta doença, a diarreia profusa.

É importante realçar também que em situações de criptosporidiose apenas um terço dos animais recebeu fluidoterapia endovenosa. Como referido no capítulo dos resultados, apenas 9 casos positivos mereceram a atuação do médico veterinário e a realização de fluidoterapia. Este é um ponto que nos parece ser interessante naquilo que poderá ser o desfecho destas situações e na melhoria mais acelerada dos sinais clínicos do animal afetado. É que em situações de diarreia profusa com desidratação evidente do animal o tratamento endovenoso é crucial, corrigindo a desidratação, restaurando o volume de sangue circulante, contrariando a acidose metabólica, corrigindo os distúrbios eletrolíticos, fornecendo energia e promovendo o restauro do epitélio intestinal (Félix, 2016).

Em relação ao manejo dos animais, importa referir que, em extensivo, a vacada anda sempre junta e que, por isso mesmo, as parições ocorrem na cerca comum a todos os animais. Muitas vezes, os bovinos adultos constituem-se como reservatórios assintomáticos do parasita e os vitelos à altura do nascimento, com o sistema imunitário ainda longe do seu auge, ficam muito suscetíveis de se contaminar com parasitas do género *Cryptosporidium*. Como referido previamente, nenhuma das explorações estudadas fornece água da rede pública de abastecimento aos seus animais, utilizando, para este efeito, águas provenientes de fontes não tratadas como, por exemplo, barragens, charcas ou furos. Pereira da Fonseca (2000) detetou, no Alentejo, 55% de amostras de águas contaminadas com o parasita. Tais resultados permitem sinalizar a água como uma fonte importante na dinâmica da propagação e perpetuação da doença nas explorações, constituindo também um fator de risco para todos os que ali trabalham (Pereira da Fonseca, 2000).

Também a sazonalidade dos partos, que se verifica nas explorações extensivas de aptidão de carne, é um fator a ter em conta no aparecimento de criptosporidiose. É sabido que a ocorrência desta doença assume maior importância nos meses de inverno e primavera

que se constituem como as alturas de maior concentração de partos, ao contrário do que acontece, por exemplo, nas explorações leiteiras em que os partos estão distribuídos ao longo de todo o ano, havendo, nestas últimas, animais na faixa etária crítica constantemente (Garber et al., 1994).

Na ausência de um protocolo vacinal eficaz contra *Cryptosporidium* spp. há algumas medidas que se podem tomar para evitar grandes surtos de criptosporidiose. Não falando aqui de questões relacionadas com o manejo e olhando única e exclusivamente para medidas médico-veterinárias podemos definir três situações distintas:

- Vacinação com Rotavec Corona® contra agentes como *E. coli*, Rotavírus e Coronavírus e a ser aplicada no último terço da gestação, fechando um pouco a porta de entrada ao oportunista *Cryptosporidium* sp. e minimizando a ocorrência da doença nas explorações;
- Utilização do Lactato de Halofuginona (Halocur®) como profilaxia;
- Tratamento sintomático de diarreias neonatais com recurso a fluidoterapia endovenosa.

A decisão do produtor em vacinar ou não as vacadas com Rotavec Corona® é, a maior parte das vezes, de cariz económico. É, de facto, uma vacina cara. Cada frasco contém 40 mL e cada dose a administrar, por via intramuscular, é de 2 mL, ficando cada dose a um preço inferior a uma dezena de euros. A grande vantagem desta vacina, conforme já mencionado, é o facto de permitir uma maior proteção dos vitelos recém-nascidos contra agentes causadores de diarreias neonatais e, dessa forma, atenuar um pouco a ação do *Cryptosporidium* spp., impedindo, a grande maioria das vezes, o aparecimento da criptosporidiose clínica mesmo que os animais estejam parasitados.

Pela experiência de clínica de campo dos médicos veterinários com quem trabalhamos a vacinação das mães com Rotavec Corona® diminui substancialmente a probabilidade de serem chamados de urgência para proceder à reidratação de um vitelo caído e, mesmo quando acontece, as melhorias subsequentes à fluidoterapia endovenosa são muito mais notórias quando comparadas com casos semelhantes provenientes de efetivos não vacinados com aquela vacina. Considerando que, por norma, nunca há só um vitelo a precisar destes cuidados numa exploração onde não se procede à vacinação, com um surto o custo inerente ao tratamento sintomático através de reidratação endovenosa pode ascender ao dobro ou triplo ou mais quando comparado com situações verificadas em explorações que vacinam as vacas gestantes contra outros agentes causadores de diarreias neonatais.

A utilização do lactato de halofuginona (Halocur®) na prevenção da ocorrência da criptosporidiose tem sido descrita por vários autores. Segundo Martins et al. (2007) e Madeira de Carvalho et al. (2011) a administração de lactato de halofuginona em animais de aptidão

leiteira demonstrou eficácia na redução da excreção de oocistos e nos sinais clínicos da doença, contribuindo para a redução da contaminação ambiental e dos riscos zoonóticos inerentes à criptosporidiose e para a melhoria do bem-estar animal. Na prática, e olhando meramente para a exploração de bovinos em regime extensivo, esta opção é muito pouco viável por uma questão de manejo. O lactato de halofuginona (Halocur®) deve ser administrado na dose de 2 mL por cada 10 kg de peso vivo, uma vez por dia durante 7 dias consecutivos. Ora, nestas explorações os animais são mantidos a campo. E este simples facto impede que este protocolo seja executado com sucesso pela menor proximidade entre o Homem e o animal em explorações deste tipo. Para além disso, o Halocur® refere na sua literatura que não deve ser administrado a animais com diarreia há mais de 24 horas, o que, em extensivo, dificulta muito a sua correta administração aos animais uma vez que a deteção rápida de diarreias neonatais é mais difícil fruto da distribuição dos animais por vastas áreas de terreno. Por experiência dos clínicos com quem trabalhamos e pelo que foi observado durante o nosso estágio, as condições e o tipo de manejo das explorações estudadas não permitem que, durante sete dias consecutivos, os vitelos sejam contidos a campo para que lhes seja administrado este medicamento.

Não havendo, portanto, um protocolo terapêutico eficaz para a criptosporidiose bovina em explorações em regime extensivo o desafio para os clínicos nesta área passa muito por encontrar alternativas preventivas para tentar controlar a ocorrência da doença nas explorações. O manejo correto dos animais e dos terrenos e a vacinação do efetivo contra alguns agentes patogénicos causadores de diarreia neonatal bovina é, na nossa opinião, o mais acertado. Como referido anteriormente, e indo contra diversos estudos já realizados, a profilaxia com lactato de halofuginona não é uma opção viável para bovinos de aptidão de carne mantidos em regime extensivo, por dificuldades inerentes ao seu próprio método de criação. A testagem e tratamento das fontes de água de bebida dos animais seria um passo importante, embora dispendioso, na tentativa de diminuir as ocorrências de criptosporidiose bovina. E este é, de facto, um ponto crucial, constituindo um verdadeiro desafio para o futuro.

Não se trata apenas de controlar as ocorrências de infeção e de doença, mas também, e numa perspetiva económica, de aumentar os ganhos dos produtores, quer através da diminuição dos custos associados ao tratamento de vitelos com sintomatologia diarreica, quer através da valorização acrescida dos animais, por poderem expressar o seu vigor genético mediante um maior ganho de peso.

4.5. CONCLUSÕES

Com este estudo concluiu-se que a percentagem global de infecção por *Cryptosporidium* spp. na amostragem obtida por conveniência de vitelos pertencentes a explorações vocacionadas para a produção de carne bovina situadas nas sub-regiões do Alentejo Central e Litoral foi de 25,7%. Através desta dissertação pode afirmar-se que os vitelos, durante o primeiro mês de vida, constituem uma importante fonte de contaminação ambiental e consequente perpetuação do problema nas explorações. Importa voltar a referir que muitos dos vitelos que não apresentam expressão clínica da doença são, no entanto, animais infetados e excretadores ativos de oocistos do parasita, constituindo uma fonte silenciosa de contaminação de outros animais, nomeadamente imunodeprimidos e recém-nascidos. Assim, a criptosporidiose é uma doença de difícil erradicação devido às próprias características do parasita que lhe conferem alta resistência nos solos e capacidade de perpetuação da doença por longos períodos de tempo nos animais e no mesmo espaço.

Para finalizar queremos citar uma frase curiosa e pertinente do nosso Orientador, o Dr. Feliciano Reis: “No dia em que um laboratório farmacêutico produza uma vacina viável e eficaz para *Cryptosporidium* spp., ficará milionário”.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, S. A., & Karanis, P. (2018). Comparison of current methods used to detect *Cryptosporidium* oocysts in stools, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, (2010), <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.04.006>
- Barros, S. V. A. (2015). Contribuição para o estudo da criptosporidiose em vitelos de explorações leiteiras da Ilha Terceira, Açores. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: *Universidade de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária*.
- Barwick, R. S., Mohammed, H. O., White, M. E., & Bryant, R. B. (2003). Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York state. *Preventive Veterinary Medicine*, 59(1–2), 1–11.
- Bouزيد, M., Kintz, E., & Hunter, P. R. (2018). Risk factors for *Cryptosporidium* infection in low and middle income countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(6), 1–13.
- Collinet-Adler, S., & Ward, H. D. (2010). Cryptosporidiosis: Environmental, therapeutic, and preventive challenges. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29(8), 927–935.
- Couto, M. C. M., Bomfim, T. C. B. (2013). Espécies de *Cryptosporidium* que infectam bovinos: características etiológicas e epidemiológicas. *Vet. Not.*, Uberlândia, v, 18, n.2, p.94-109, jul./dez. 2012.
- Dawson, D. (2004). Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology*, 103 (2005), 207–227.
- De Graaf, D. C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L. M., Abbassi, H., & Peeters, J. E. (1999). A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 29(8), 1269–1287.
- Duranti, A., Cacciò, S. M., Pozio, E., Di Egidio, A., De Curtis, M., Battisti, A., & Scaramozzino, P. (2009). Risk factors associated with *cryptosporidium parvum* infection in cattle. *Zoonoses and Public Health*, 56(4), 176–182.
- Fayer, R., Ungar, B.L.P. (1986). *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50 (4), 458–483.
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., & Zarlenga, D. (1998). *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: Dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 49–56.
- Fayer, R., Morgan, U., & Upton, S. J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1305–1322.
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126 (1-2 SPEC.ISS.), 37–56.

- Fayer, R., Santín, M., Trout, J. M., & Greiner, E. (2005). Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, 135(2), 105–112.
- Fayer, R. (2008). General Biology. In R. Fayer & L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium and Criptosporidiosis*. (2nd ed.) (pp. 1-42). NW: CRC Press.
- Fayer, R., Santín, M., & Trout, J. M. (2008). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156(3–4), 191–198.
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124(1), 90–97.
- Félix, J. D. S. N. (2016). Tratamento de diarreias neonatais em vitelos. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: *Universidade de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária*, pp 30-33.
- Foster, D. M., & Smith, G. W. (2009). Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 25(1), 13–36.
- Garber, L.P., Salman, M.D., Hurd, H.S., Keefe, T., Schlater, J. L. (1994). Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Vol 205, No.1, July 1, 1994, 86-91.
- Hemphill, A., Müller, N., & Müller, J. (2019). Comparative Pathobiology of the Intestinal Protozoan Parasites *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium parvum*.
- Instituto Nacional de Estatística (2019). Acedido em agosto de 2019, disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_main.
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2019). Área Educativa – Clima de Portugal Continental. Acedido em julho e agosto de 2019, disponível em: <https://www.ipma.pt/pt/educativa/tempo.clima/>.
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2019). Normais climatológicas. Acedido em julho e agosto de 2019, disponível em: <https://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/>.
- Joachim, A. (2004). Human Cryptosporidiosis: An Update With Special Emphasis on the Situation in Europe, 259, 251–259.
- Mac Kenzie, W. R., Hoxie N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., Davis, J. P. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine* (Vol. 331).
- Madeira de Carvalho, L. M., Martins, S., Sousa, S., Bacelar, J., & da Silva, J. (2011). *Cryptosporidium* spp. as a major agent of calf diarrhea: Epidemiology and Control with Halofuginone Lactate in Portugal. *Lecznica Duzych Zwierzat*, 2, 35-41
- Martins, R. (2018). *Cryptosporidium*: Um desafio constante. Revista Notícias Limousine, nº26, pp 86-88. Associação Portuguesa de Criadores de Bovinos da Raça Limousine. www.limousineportugal.com

- Martins, S., Sousa, S., Madeira de Carvalho, L. M., Bacellar, J., & da Silva, J. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infection in Northwest Portugal Dairy Calves and Efficacy of Halofuginone Lactate on the Prevention of Cryptosporidiosis. *Cattle Practice*, 15(2), 152–156.
- Mendonça, C., Almeida, A., Castro, A., de Lurdes Delgado, M., Soares, S., da Costa, J.M., Canada, N. (2007). Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet Parasitol*, 147, 47-50.
- O'Handley, R. M., & Olson, M. E. (2006). Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants, 22, 623–643.
- O'Hara, S. P., & Chen, X. M. (2011). The cell biology of *cryptosporidium* infection. *Microbes and Infection*, 13(8–9), 721–730.
- Olson, M. E. (2002). *Cryptosporidium* and *Giardia*: Emerging zoonoses (pp 24-30). www.dvmnewsmagazine.com
- Olson, M. E., Handley, R. M. O., Ralston, B. J., McAllister, T. A., & Thompson, R. C. A. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle, 20(4).
- Pereira da Fonseca, I. M., Mariano, I., & Lopes, S. (1997). *Cryptosporidium parvum* em bovinos na região de Montemor-o-Novo (Portugal). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 92 (524): 162-164 (1998).
- Pereira da Fonseca, I. M. S. (2000). Contribuição para o estudo da criptosporidiose animal em Portugal: Caracterização genética de isolados de *Cryptosporidium parvum* de origem bovina. Tese de Doutoramento. *Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa*.
- Rodriguez, J. C., & Royo, G. (2001). *Cryptosporidium* y criptosporidiosis. *Control Calidad SEIMC*, 1–7.
- Ryan, U., Zahedi, A., & Paparini, A. (2016). *Cryptosporidium* in Humans and Animals - a One Health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology* 2016; 38: 535–547.
- Ryan, U., Paparini, A., Monis, P., Hijjawi, N. (2016). It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry?, *Water Research* (2016), doi: 10.1016/j.watres.2016.09.013.
- Santin, M., Trout, J.M. (2008). Livestock. In R. Fayer & L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium and Criptosporidiosis*. (2nd ed.) (pp. 451-483). NW: CRC Press.
- Santin, M., Trout, J.M., Fayer, R. (2008). A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, 155, 15-23.
- Smith, H. V., Cacciò, S. M., Cook, N., Nichols, R. A. B., & Tait, A. (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*, 149(1–2), 29–40.
- Thomson, S., Hamilton, C. A., Hope, J. C., Katzer, F., Mabbott, N. A., Morrison, L. J., & Innes, E. A. (2017). Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Veterinary Research*, 48(1), 42.

- Wikipédia (2019). Alcácer do Sal. Acedido em julho de 2019, disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Alcácer_do_Sal.
- Wikipédia (2019). Alentejo Central. Acedido em julho de 2019, disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Alentejo_Central.
- Wikipédia (2019). Alentejo Litoral. Acedido em julho de 2019, disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Alentejo_Litoral.
- Wikipédia (2019). Arraiolos. Acedido em julho de 2019, disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Arraiolos>.
- Wikipédia (2019). Montemor-o-Novo. Acedido em julho de 2019, disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Montemor-o-Novo>.
- Wikipédia (2019). Redondo. Acedido em julho de 2019, disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Redondo>.
- Wikipédia (2019). Reguengos de Monsaraz. Acedido em julho de 2019, disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Reguengos_de_Monsaraz.
- Wikipédia (2019). Vendas Novas. Acedido em julho de 2019, disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Vendas_Novas.
- World Organisation for Animal Health (2016). Cryptosporidiosis. *OIE Terrestrial Manual* (Chapter 2.9.4).
- Wyatt, C. R., Riggs, M. W., & Fayer, R. (2010). Cryptosporidiosis in Neonatal Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 26(1), 89–103.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., & Upton, S. J. (2004). *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 72–97.

ANEXOS

ANEXO 1 – INQUÉRITO

INQUÉRITO

(janeiro de 2019 a maio de 2019)

O presente inquérito enquadra-se num estudo de determinação de infeção por *Cryptosporidium* spp. em vitelos pertencentes a explorações de carne das sub-regiões do Alentejo Central e Litoral.

Esta parasitose é provocada por protozoários pertencentes ao género *Cryptosporidium* e a sua transmissão é feita através da via fecal-oral, podendo ocorrer de forma direta – contacto com hospedeiros doentes – ou indireta – ingestão de água ou alimentos contaminados.

Cryptosporidium parvum é a espécie com maior potencial zoonótico e os vitelos até às quatro semanas de vida constituem o seu principal reservatório. Nestes animais, a doença manifesta-se pelo aparecimento de diarreias líquidas e profusas acompanhadas por depressão, desidratação, anorexia e, em certos casos, culminando na morte dos mesmos.

A falta de vacinação e tratamento eficaz para a doença constituem um entrave e um desafio para os médicos veterinários e produtores, sendo importante identificar os fatores que ajudam na perpetuação do parasita nas explorações de forma a ser possível estabelecer protocolos profiláticos que reduzam o impacto económico na produção e melhorem a saúde pública.

1. Exploração/Produtor

2. Qual é a percentagem de casos de diarreias neonatais na exploração? (escolha uma opção)

- <10% ____
- 10-25% ____
- 25-50% ____
- >50% ____

3. Nos casos de vitelos com diarreia procedeu-se à fluidoterapia por via endovenosa durante o período do presente estudo? (escolha uma opção)

- Sim ____
- Não ____

4. Se respondeu afirmativamente à questão anterior, por favor, responda às seguintes questões

- Quais as situações que mais frequentemente exigem a terapia de fluidos nesta exploração?
 - ✓ Vitelo caído ____
 - ✓ Vitelo que não mama ____
 - ✓ Vitelo com diarreia ____
 - ✓ Vitelo com sangue nas fezes ____
 - ✓ Outro. Especifique _____

- Qual o protocolo terapêutico mais utilizado na exploração? (escolher as opções que se aplicam)
 - ✓ Antibióticos ____
 - ✓ Anti-inflamatórios ____
 - ✓ Fluidoterapia ____
 - ✓ Outro. Especifique _____

- Como se procede após a reidratação do animal? (escolha uma opção)
 - ✓ Vitelo a campo ____
 - ✓ Vitelo recolhido em abrigos ____

5. Profilaxia da vacada (escolher as opções que se aplicam)

- ✓ Vacinação com Multivac 9 ® (clostridioses) ____
- ✓ Vacinação com Rotavec Corona ® no último terço da gestação (*E.coli*, Rotavírus e Coronavírus) ____

6. Qual a origem da água de bebida dos animais?

- Rede de abastecimento pública ____
- Abastecimento próprio ____
Especifique:
 - ✓ Barragem ____
 - ✓ Charca ____
 - ✓ Poço ____
 - ✓ Furo ____
 - ✓ Ribeira ____

7. Se a resposta à questão anterior tiver sido “Abastecimento próprio”, por favor, indique se nesta exploração é feito ou não algum tipo de testagem e tratamento às suas águas?

- ✓ Sim ____ Qual(ais)? _____
- ✓ Não ____